UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología y Farmacología

Efectos de distintas estrategias terapéuticas sobre los déficits cognitivos y las alteraciones neuromorfológicas de un modelo de síndrome de Down

Tesis doctoral presentada por Sara Lantigua Romero para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria

Santander, mayo 2017

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología y Farmacología

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

Que **Dña. Sara Lantigua Romero** ha realizado bajo nuestra dirección el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado: ‘’Efectos de distintas estrategias terapéuticas sobre los déficits cognitivos y las alteraciones neuromorfológicas de un modelo de síndrome de Down’’.

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

Santander, 19 de mayo de 2017.

Fdo. Carmen Martínez-Cué Pesini

Fdo. Noemí Rueda Revilla

Este trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en el Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje del Departamento de Farmacología y Fisiología de la UC bajo la dirección de las Dras. Carmen Martínez-Cué Pesini y Noemí Rueda Revilla, entre enero de 2014 y mayo de 2017.

Este trabajo ha sido financiado por:

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

Out of the night that covers me,
Black as the pit from pole to pole,
I thank whatever gods may be
For my unconquerable soul.

In the fell clutch of circumstance
I have not winced nor cried aloud.
Under the bludgeonings of chance
My head is bloody, but unbowed.

Beyond this place of wrath and tears
Looms but the Horror of the shade,
And yet the menace of the years
Finds and shall find me unafraid.

It matters not how strait the gate,
How charged with punishments the scroll,
I am the master of my fate:
I am the captain of my soul.

William Hernest Henley

Y una vez que la tormenta termine, no recordarás cómo lo lograste, cómo sobreviviste. Ni siquiera estarás seguro si la tormenta ha terminado realmente. Pero una cosa sí es segura. Cuando salgas de esa tormenta, no serás la misma persona que entró en ella. De eso se trata esta tormenta.

“Kafka en la orilla”, Haruki Murakami.

Agradecimientos

“Son nuestras elecciones, más que nuestras habilidades, las que demuestran realmente cómo somos”. Cuando decidí realizar una tesis doctoral no era consciente del gran reto al que me enfrentaba. Llevar a cabo una labor de este tipo requiere un gran esfuerzo y un constante crecimiento profesional y personal del que me siento sumamente orgullosa. Por ello, quiero dar las gracias a todos aquellos que me han prestado su ayuda, contribuyendo a que haya llegado hasta aquí.

Quisiera empezar dando las gracias a mis directoras de tesis, a Carmen Martínez-Cué por aceptarme en su laboratorio y brindarme esta gran oportunidad, por ayudarme en todo lo posible, enseñarme, escucharme siempre y, sobre todo, por confiar en mí en todo momento.

También quisiera agradecerle en la misma medida toda la ayuda prestada por Noemí Rueda, que ha llevado a cabo una labor incansable trabajando en todo momento dando lo mejor de sí para que este trabajo saliera adelante, ayudándome y apoyándome cuando lo he necesitado y aconsejándome para que sacara lo mejor de mí a lo largo de estos tres años.

Ambas me han enseñado lecciones muy valiosas que llevaré conmigo siempre y ambas lideran un equipo que se basa en el trabajo, el esfuerzo y la comprensión que me ha formado como científica y me ha hecho sentir en casa.

Por supuesto quisiera dar las gracias a cada miembro de mi equipo por su contribución a esta tesis.

Las personas con las que construyes algo que te apasiona son quizás las más especiales. Por haberme hecho partícipe del diseño del primer proyecto que llevé a cabo sola, por confiar en mí cuando yo no lo hacía, por enseñarme todo lo necesario para que me convirtiera en una persona autónoma capaz de emprender cualquier tarea dentro del laboratorio y, sobre todo, por compartir tu brillantez y tu gran talento conmigo, gracias Su.

Las personas exitosas de las que te rodeas consiguen contagiarte sus éxitos. Por llevar a cabo una labor maravillosa en el laboratorio que todos deberíamos agradecerte, por entregarte en todo lo que haces para sacar lo mejor de cada situación y, en particular, por enseñarme desde el primer día todo lo que sabes demostrando ser una gran

compañera con una infinita paciencia, preocupándote cada día por mí dentro y fuera del laboratorio, además de por encontrar siempre TODO lo que pierdo, gracias Vero.

Las personas excepcionales son piezas claves en todos los equipos. Por cuidarme desde el primer día que llegué, por apoyarme siempre, por tus maravillosos consejos sobre el trabajo y sobre la vida, por hacerme sentir querida e incluida en el laboratorio, por ser el engranaje perfecto para todas, alguien indispensable para el equipo de trabajo, y por toda la ayuda que me prestas constantemente para que mi trabajo salga adelante, gracias Eva.

Las personas que intentan superarse cada día a sí mismas son personas que todos deberíamos tener al lado, inspirándonos a ser mejores. Por tu gran constancia, por tus constantes ganas de mejorar y aprender creciendo a todos los niveles y por la comprensión y dulzura que me demuestras cada día, gracias Marián.

Las personas que aportan alegría son personas que merecen ser mencionadas aparte, aunque el tiempo que pasemos con ellas sea corto, es un tiempo inolvidable. Por compartir tu vida dentro y fuera del laboratorio conmigo, por animarme y aportarme un gran cariño, por las risas, por los bailes, por la fiesta y por los llantos, gracias Edu, fuiste una persona muy especial y fue un placer trabajar contigo.

Gracias también a mis compañeros que ya no están en el laboratorio, a Andrea por los consejos cuando empecé, a Paula por hacer de asesora diciéndome que hay luz y futuro laboral, a Andrea el italiano por su pasión, por sus consejos científicos y por sus debates sobre ciencia para ayudarme a mejorar y a las técnicos recientemente incorporadas Mati e Irene por encargarse de la conducta para despejar el camino durante la escritura de mi tesis.

Quiero dar las gracias también al laboratorio vecino de Maruja Hurlé, por ser unos compañeros maravillosos dispuestos a prestar su ayuda siempre que lo he necesitado. Gracias a la propia Maruja por darnos sabios consejos laborales. Gracias a Nieves por su predisposición, por ayudarnos en todo momento y por su dulzura. A Mónica por haber compartido tantos botes de leche y café conmigo, imprescindibles para trabajar despierta durante este tiempo. A Ana Cayón por ser una trabajadora incansable dispuesta a ayudar siempre que se la necesita. A Ana Villar por las dudas sobre

bioquímica y por su “gran cabeza” que comparte con todos lo que le piden ayuda. A Raquel García y Raquel Francés, por las horas de biblioteca y los consejos laborales y, muy en especial, a mi “santa María”. Gracias María, por haberme enseñado tantas cosas a nivel profesional para mejorar mis experimentos, por alimentarme durante las semanas que entré en huelga de cocina por la dedicación a la tesis, por ser noble, sincera y franca, por tus buenos consejos y por escucharme y preocuparte por mí todo este tiempo.

Gracias también a todo el Departamento de Farmacología que aún queda en Medicina, a Ayesta por ayudarme con la estadística, a Luis Alberto por todo el jaleo de papeles. Al equipo de trabajo de Fisiología, por estar siempre tan dispuestos a facilitarnos el trabajo, especialmente a Gema. Al equipo de trabajo de los Lafarga, por dejarme usar su laboratorio siempre que lo he necesitado, a Jorge, Oriol y Olga. Al laboratorio de Anatomía por prestarme su ayuda y resolver mis dudas, a Nacho, Susana y Sonia. Al laboratorio de Ángel Pazos, Álvaro, Elena, Fuen, Josep y Emilio, así como al laboratorio de Elena Cabezón especialmente a Yolanda. A Víctor, el técnico de microscopía del IBBTEC, que me ha enseñado muchísimo sobre el tratamiento de imágenes, es una persona brillante en su campo que siempre está dispuesto a mejorar y refinar todo el trabajo que hacemos.

Por supuesto quiero agradecer al personal del estabulario toda la ayuda prestada durante estos tres años. A Miguel por su comprensión en el desarrollo de todos los proyectos que he realizado en el estabulario durante mi tesis. A Lourdes por su profesionalidad y por cuidar de todos mis animales. A Mar por enseñarme tantas cosas a lo largo del desarrollo de mi tesis, por intentar trasmitirme sus conocimientos y en definitiva por ser una profesional competente y entregada en su labor, por ayudarme siempre sin importar las horas ni la hora que fuese y por todo el cariño que pone en lo que hace. También quiero dar las gracias a Bea, Goyo, Dani y Patri.

Quiero hacer una mención especial y agradecerle sus enseñanzas y su apoyo al laboratorio de José María Medina de Salamanca y muy en especial a Ana Velasco por la oportunidad que me brindó para la realización de mi Trabajo de Fin de Máster. Ana y todo su grupo me enseñaron muchísimo a nivel laboral, gracias a ella pude emprender el camino en ciencia y siempre ha estado ahí cuando la he necesitado. Es una magnífica

persona y una magnífica científica con la que me encantó trabajar y una persona que me gustaría conservar siempre, se merece lo mejor en todos los sentidos.

Al igual que un entorno laboral adecuado es imprescindible para un óptimo desarrollo profesional, un entorno personal equilibrado es el que te prepara para salir al "mundo real" y triunfar.

Dicen que no escogemos a la familia, la familia donde nacemos, simplemente nos toca. Así que yo puedo afirmar con toda seguridad, que fui afortunada en el reparto y que gracias a ellos soy la persona actual, todo lo que soy se lo debo a ellos, todos y cada uno de los miembros de mi familia conforman la persona que soy ahora.

A mis padres por ser los mejores padres que alguien puede desear, no se puede tener más suerte. A mi madre, Tere, esa gran mujer de la que me siento orgullosa, que ha luchado a brazo partido cada día para sacarme adelante a pesar de las circunstancias que le han tocado vivir, que me ha entregado su amor incondicional para que fuera una personal feliz y no me faltara de nada, que me ha empujado siempre a avanzar para ser mejor. Por entregarme todo lo que tienes, gracias mamá. Hay más de ti en mí de lo que te imaginas. Eres y siempre serás la persona más importante de mi vida, gracias por quererme tanto, por confiar en mí, por ser mi madre y mi amiga y convertirme en lo que soy, este doctorado es de las dos.

A mi padre Constan, por ser un padre maravilloso, por confiar en mí, transmitirme todo lo que sabe y ser mi amigo y, por supuesto, por sacarse mano a mano conmigo, todos mis títulos. Gracias papá por todas las horas de clases particulares, por animarme siempre, "porque sacar un cero no es mala señal, significa que no sabes nada y es bueno porque puedes aprenderlo todo", por respetar todas mis decisiones y por darme autonomía. Pero, sobre todo, gracias por todas nuestras fantásticas aventuras, vacaciones desternillantes, acampadas improvisadas y acampadas accidentadas, caminatas "sin retorno", incursiones a paraísos inexplorados con helicópteros incluidos, construcciones para enanitos y un largo etc. a las que siempre puedo volver en los momentos más bajos. En definitiva, gracias por ser mi padre.

A mi hermano Javier. Una de las relaciones más especiales y cómplices que existen en el mundo son las relaciones con los hermanos pequeños, todo lo que tengo se lo dedico a

él, por ser mi luz en todos los momentos oscuros, por enseñarme que el amor a primera vista existe, por convertirme en una persona mejor para él incitándome a mejorar cada día para merecer esa admiración con la que me mira. Siempre cuidaré de ti.

A mis tías maternas, por ser un pilar fundamental en mi vida, por criarme, por cuidar de mí, por apoyarme de manera incondicional y por acompañarme siempre por muy lejos que vaya. A mi tía Leo, una de las mejores madres y personas que conozco, por tratarme como a una hija, sin hacer nunca distinciones, por su entrega, sus conversaciones, su cultura, por toda su implicación en mi educación, por preguntarme siempre la tarea. A mi tía, Paqui, porque se ha esforzado a lo largo de toda su vida por hacerme feliz, por haber vivido conmigo durante la mitad de mi vida y convertirla en la mejor época, por querer tenerme siempre a su lado, por ser mi amiga, por cuidar de Walky, por hacerme sentir especial, por toda su ayuda. Sin vosotras dos no estaría donde estoy. Es imposible daros las gracias o expresar lo que significáis para mí en un simple párrafo, así que simplemente os diré gracias por el esfuerzo, por creer en mí inculcándome la idea más valiosa que uno puede tener "cree en ti mismo" y sobre todo por quererme tal y como soy. A mi tía Maricarmen por su gran cariño y comprensión y a mi tío Tomás. Y a mis tíos maternos, a los dos Ramones, a Juan por su humor y su cariño y por querer que gane el Nobel ayudando a la humanidad descubriendo el crece pelo y a mi tío Bartolo que me abrió las puertas de su casa cuando lo necesité.

A mis primos, a Paco por ser un gran referente, una bellísima persona y un gran primo mayor. A mi prima Arantxa, por toda nuestra complicidad y nuestra historia, por haber sido mi gran amiga de la infancia, por querer crecer y jugar conmigo, por compartir toda tu adolescencia conmigo, por ser una de mis personas favoritas y brindarme la oportunidad de conocer lo que es tener una hermana con quien jugar cuando eres hija única hasta los 17 años, gracias. A mis niños especiales, a mi primo Pablo por darme otra perspectiva de la vida, la suya, por llenarnos a todos de alegría con su llegada, por sus apasionantes charlas sobre cine y por marcar la diferencia; a mi pequeña Alejandra, por todo su amor, por toda la fuerza que transmite a quien tiene al lado, por ser un gran apoyo, por su lealtad, por llegar en el momento adecuado para ser la niña de la casa, para que todos cuidáramos de ella, por ser tenaz, independiente y luchadora, estoy muy orgullosa de ti y de la mujer en la que te estás convirtiendo.

Gracias a todos los Romero por ser personas excelentes, por transmitir valores únicos, por priorizar siempre la familia y el sentimiento de unidad pero, sobre todo, gracias por estar siempre presentes y dar tanto amor.

A mis tíos paternos, a José, por ser mi tío paterno favorito, por ser un tío genial y por quererme y apoyarme tanto, por supuesto por haberte casado con Pimpa, para traerla a casa y que fuera mi amiga y confidente a lo largo de todos estos años. Gracias a los dos por haberme ayudado en todo momento, por las maravillosas vacaciones de mi niñez, por la Graciosa, por Fontanales, por llevarme de pesca, por venir a verme a todas las ciudades a las que me he mudado, por pasaros largas horas al teléfono y por estar presentes en todos mis momentos bajos desde que salí de casa y me independicé. A mi primo Joche, por su confianza, por estar a mi lado y por sus sabios consejos. A Patri, mi tía paterna preferida y a Carlos, por creer en mí y a mi primo Néstor y mi prima Miriam por ser tan especial conmigo preocupándose siempre. A mis chicas Violeta y Violetita por sus audios para animarme en los peores momentos de la tesis. Por supuesto a mi abuela, por ser mi abuela preferida, por ser una gran señora, por sus cuidados, su apoyo incondicional y su fe en mí. Gracias a los Lantiguas por ser únicos, irrepetibles, carismáticos, e increíbles, por haberme transmitido lo mejor de vosotros y por cada 25 de diciembre.

Si la familia no se escoge, los amigos son la familia que podemos elegir. Todos y cada uno de mis fantásticos amigos han sufrido a cada paso de la tesis doctoral conmigo, y se han alegrado a su vez por todos mis aciertos. A todos y cada uno, gracias, por aceptar el abandono casi total en el último año de mi vida social y por su gran comprensión.

A mis amigas de toda la vida, por acompañarme a lo largo de todo el viaje y por conocerme en ocasiones mejor que yo misma, por crecer conmigo y formar parte de mi familia. Gracias a Hari por ser simplemente ella en todo su esplendor, auténtica, indomable y profundamente especial, gracias por quererme SIEMPRE; a Jariza por ser una amiga totalmente excepcional, por todos tus sabios consejos, por entenderme y respetarme SIEMPRE, todos deberíamos tener una amiga como tú. Gracias a ambas por estos 19 años de amistad y por los que quedan.

A mi amigo Aure, por hacerme ver la vida de otro color siempre que tenemos una charla, por reenseñarme la isla en vacaciones y por estar en mi vida prácticamente desde siempre. A mi eterno amigo del pueblo Fran por ser diferente y por ayudarme cuando tanto lo he necesitado.

A mis amigos de Salamanca por supuesto, por hacer de mis años universitarios los mejores de mi vida y por acogerme en su familia cuando llegué de Canarias. A la propia ciudad dorada donde siempre me reencuentro conmigo misma. A Fray y a la residencia Oviedo. A mis grandes amigas, mis biólogas, a Bea por compartir tantas cosas, nuestros sueños y un gran período en nuestras vidas y por su incondicional entrega a sus amigas. A Nai por ser una de mis almas gemelas, por hacerme feliz solo con su presencia, por ser tan distinta y tan igual en esencia a mí, por TODO imposible de explicar en una línea de agradecimientos, siempre te llevo conmigo, "La verdadera amistad no se trata de ser inseparables, sino de estar separados sin que nada cambie", y a sus padres Ito y Yoli. A Marta porque no entiendo una vida sin ella, por ser una persona imprescindible en mi vida, por toda la historia Charra, por ser capaz de venir a Santander a acompañarme a hacer la tesis y sufrirla conmigo, en definitiva, por existir y toparte conmigo en este camino que llamamos vida. A mi pareja de biólogos-men favorita, a Miguel por nuestras juergas, nuestra complicidad y todas nuestras conversaciones, a Iñaki por su sensibilidad especial y por ser un amigo maravilloso, gracias por vuestra amistad a lo largo de estos años y por darme un respiro cada vez que me acogéis en Bilbao.

A Fran mi "cariño" mi mejor amigo para siempre, por encontrarme tan pronto en esta vida para que pudiéramos pasar el mayor tiempo juntos, por sacar lo mejor de mí SIEMPRE, por integrarme en su casa, "Un hilo rojo conecta a las personas destinadas a encontrarse…", por todo lo vivido, y a toda su familia, en especial a su madre y sus abuelos. A Andrea porque consigue que mis mejores momentos siempre sean a su lado, incluso al otro lado del teléfono, por nuestros mil millones de historias, por la 002, por las croquetas, por nuestras casas, por formar el tándem perfecto, por "que paren las pipetas" te echo de menos cada día. Gracias a los dos por formar "la casita de ensueño", por bonito, por Ezqui, por Casa-Curro y Narnia, mi hogar siempre está a vuestro lado.

A todas las personas con las que conviví y me apoyaron para lograr mi sueño de convertirme en doctora, a Noe, a Pilar a Elisa, a Guti. A mi David, por ser lo mejor de mi

2013, por ser mi compañero de barra, por los desayunos a las 6 A.M. después del trabajo, por descolgarse de las ventanas para abrirme las puertas, por ser mi príncipe azul y por su gran amistad.

A mis chicas de Santander, en especial a Sara, por acogerme en la ciudad cuando llegué, por integrarme con sus amigos, por demostrar ser una fantástica persona cuando más la necesitaba y acabar convirtiéndose en una fantástica amiga y a sus padres, que vinieron a achicar agua a casa cuando exploto la caldera, nunca podré agradecerte suficiente lo bien que te has portado conmigo. A Rosalía, a Bárbara y a Clara por los cafés, por las pizzas, por las cenas, por las noches, por los días, por la playa, por los cumples de la peque y por un largo etc. Gracias por ayudarme durante estos tres años, por haber querido tenerme a vuestro lado en una de mis peores épocas, por aguantar la tesis. Compensa que en Santander no salga el sol, porque vosotras añadís brillo a mis días. Mil millones de gracias. A Adri mi amigo cántabro, por estar a mi lado durante estos tres años, por haberme acogido de una manera maravillosa, por mi interminable mudanza, por los veranitos en Cañadío, por esperarme siempre en el parking de medicina para alegrarme la tarde, por ponerle su humor agridulce a mi vida y por ser un buen y leal amigo.

El amor siempre nos hace mejorar, es la base sobre la que se sustentan todas las cosas que merecen la pena y la emoción que nos impulsa, es y siempre será la mayor fuerza del ser humano venciendo incluso al miedo. Por elegir darme amor cada día, por ser mi compañero y resistir esta tesis conmigo y por lograr que supere mis miedos, gracias Cristian. Gracias por elegir crecer a mi lado y por construir algo que merece la pena, nuestro futuro. Una de las mejores cosas de mi vida es estar en la tuya. Sin ti no podría haber aguantado la presión que me ha supuesto este trabajo. Gracias también a Eva, Jesús y sus hijos por ser mi familia durante estos años en Santander.

Presentar esta tesis es el final de muchas cosas, de una gran etapa, pero sobretodo es el comienzo de otra donde podré poner en práctica todo lo aprendido y seguir luchando para triunfar y sobre todo, para lo más importante, para ser feliz.

A mi madre,

A mi padre,

A Leo y Paqui,

A Javier

Índice

Abreviaturas..... 1

Introducción..... 7

1. El síndrome de Down 7

1.1. Origen de la trisomía 21 7

1.2. El cromosoma 21 humano: descripción y relación con el SD 8

1.3. Características fenotípicas del SD 9

1.4. Neurobiología del SD..... 10

1.1.1. Alteraciones en los sistemas cognitivos 10

1.4.1. Alteraciones morfológicas del SNC..... 13

1.4.2. Alteraciones neuroquímicas..... 15

1.4.3. Alteraciones en procesos que agravan la neurodegeneración..... 17

1. El sistema GABAérgico y su implicación en el síndrome de Down 17

1.5. El receptor $GABA_A$ 19

1.5.1. Farmacoterapia dirigida a los receptores $GABA_A\alpha5$ 20

2. Papel neuroprotector de los ácidos oleico y linolénico..... 23

2.1. Ácido oleico..... 23

2.2. Ácido linolénico..... 25

3. Curcumina..... 27

4. Modelos murinos de síndrome de Down 29

4.1. El ratón Ts65Dn como modelo de síndrome de Down..... 29

4.1.1. Alteraciones neuromorfológicas 30

4.1.2. Alteraciones en la neurogénesis..... 31

4.1.3. Alteraciones en la conectividad sináptica 32

4.1.4. Desequilibrio en el balance excitación-inhibición cerebral: el papel del GABA y el glutamato..... 35

4.1.5. Alteraciones en la plasticidad sináptica y en la LTP..... 37

4.1.6. Neurodegeneración 37

4.1.7. Alteraciones cognitivas y conductuales..... 38

Objetivos..... 43

Material y métodos 47

1. Animales de experimentación 47

1.1. Mantenimiento y manipulación de los animales 47

1.2. Obtención del modelo animal 47

1.3. Cariotipado de los animales 47

1.3.1. Obtención y preparación de las muestras 48

1.3.2. PCR cuantitativa en tiempo real 48

1.4. Grupos experimentales y tratamientos farmacológicos 50

1.4.1. Estudio 1: Efecto de la administración a largo plazo de un modulador alostérico negativo para la subunidad α5 del receptor $GABA_A$ sobre los déficits cognitivos y neuromorfológicos del ratón TS 50

1.4.2. Estudio 2: Efecto de la administración prenatal de ácido linolénico, ácido oleico y curcumina sobre la neurogénesis hipocampal del ratón TS 52

2. Caracterización cognitivo-conductual 54

2.1. Reflejos sensoriales y función motora 54

2.2. Ansiedad: campo abierto y laberinto en cruz 58

2.3. Atención y actividad exploratoria: tabla de agujeros 60

2.4. Aprendizaje y memoria: laberinto acuático de Morris y test de condicionamiento del miedo 61

3. Caracterización neuromorfológica 66

3.1. Perfusión y preparación de los tejidos 66

3.1.1. Estudio 1 66

3.1.2. Estudio 2 66

3.2. Histología e inmunohistoquímica 67

3.2.1. Tinción de Nissl 67

3.2.2. Tinción con DAPI 68

3.2.3. Inmunofluorescencia en tejido en suspensión 69

3.2.4. Inmunohistoquímica de la densidad de células proliferativas (Ki67) 70

3.2.5. Inmunohistoquímica de la densidad de células en diferentes estadíos de proliferación (DCX y CLR) 70

3.2.6. Inmunofluorescencia de los marcadores de sinapsis excitadoras e inhibidoras VGluT1 y VGAT 71

3.2.7. Inmunohistoquímica con DAB 73

3.3. Recuentos celulares y técnicas estereológicas 74

3.3.1. Evaluación del volumen del DG y del área de la SGZ del hipocampo 74

3.3.2. Cuantificación de los precursores neurales en la SGZ del DG en el hipocampo. 75

3.3.3. Cuantificación de las poblaciones celulares de la SGZ en diferentes fases de diferenciación 75

3.3.4. Cuantificación de neuronas granulares en el DG 76

3.3.5. Cuantificación de la densidad de sinapsis GABAérgicas y Glutamatérgicas en el hipocampo 77

4. Análisis estadístico de los resultados 77

Resultados 81

1. Estudio 1. Efecto de la administración a largo plazo de un modulador alostérico negativo para la subunidad α5 del receptor $GABA_A$, sobre los déficits cognitivos y neuromorfológicos del ratón Ts65Dn 81

1.1. Efectos sobre las alteraciones cognitivas y comportamentales del ratón TS 81

1.1.1. Cognición 81

1.1.1.1. Prueba de condicionamiento de miedo (CFC) 81

1.1.1.2. Laberinto acuático de Morris (MWM) 82

1.1.2. Ansiedad y actividad general 95

1.1.2.1. Campo abierto 95

1.1.2.2. Laberinto elevado en cruz 97

1.1.3. Capacidad de atención y actividad exploratoria (Tabla de agujeros) 99

1.1.4. Habilidades sensoriales y coordinación motora 100

1.1.4.1. Habilidades sensoriales: Pruebas sensorimotoras 100

1.1.4.2. Coordinación motora: Rotarod 102

1.2. Efectos sobre los déficits neuromorfológicos del ratón TS 103

1.2.1. Proliferación de progenitores neurales (Ki67) en la SGZ del hipocampo 103

1.2.2. Diferenciación celular en la SGZ del hipocampo (DCX y CLR) 105

1.2.3. Densidad de células granulares maduras ($DAPI^+$) en el hipocampo 107

1.2.4. Balance sináptico excitador (VGluT1) – inhibidor (VGAT) en el hipocampo 108

2. Estudio 2. Efecto de la administración prenatal de ácido linolénico, ácido oleico y curcumina sobre la neurogénesis hipocampal del ratón TS 112

2.1. Análisis de los niveles plasmáticos de ácido linolénico, ácido oleico y curcumina ... 112

2.2. Efecto sobre la viabilidad en el parto y la natalidad 113

2.3. Efecto sobre el peso corporal y cerebral 114

2.4. Efectos sobre la neurogénesis hipocampal del ratón TS 117

2.4.1. Influencia del tratamiento sobre la anatomía hipocampal, tinción de Nissl 117

2.4.2. Proliferación de progenitores neurales en la SGZ del hipocampo (BrdU) 119

2.4.3. Densidad celular en el DG del hipocampo 122

Discusión 127

1. Estudio 1. Efecto de la administración a largo plazo de un modulador alostérico negativo para la subunidad α5 del receptor $GABA_A$ sobre los déficits cognitivos y neuromorfológicos del ratón Ts65Dn 127

1.1. Efectos de la administración de RO4938581 sobre los déficits cognitivos del ratón TS 128

1.1.1. Efectos sobre las alteraciones en la memoria y el aprendizaje del ratón TS. Mecanismos implicados en los efectos pro-cognitivos 128

1.1.1.1. Balance de inhibición-excitación en el hipocampo 131

1.1.1.2. Neurogénesis y la supervivencia neuronal 132

1.2. Efecto sobre la actividad exploratoria y la capacidad de atención 134

1.3. Efectos sobre la actividad general 135

1.4. Efectos sobre la ansiedad 136

1.5. Efectos sobre los reflejos sensoriales y la coordinación motora. 137

2. Estudio 2. Efecto de la administración prenatal de ácido linolénico, ácido oleico y curcumina sobre la neurogénesis hipocampal del ratón TS 139

2.1. Análisis de los niveles plasmáticos de ácido linolénico, ácido oleico y curcumina ... 140

2.2. Efecto sobre la viabilidad en el parto y la natalidad 140

2.3. Efecto sobre el peso corporal y cerebral 142

2.4. Efecto sobre las alteraciones anatómicas y neuromorfológicas hipocampales 143

2.4.1. Efectos sobre las alteraciones neuroanatómicas del hipocampo 143

2.4.2. Efectos sobre la hipocelularidad y la proliferación celular del hipocampo 145

2.4.2.1. Efectos pro-neurogénicos de la curcumina 145
2.4.2.2. Efectos pro-neurogénicos del ácido oleico 148
2.4.2.3. Efectos pro-neurogénicos del ácido linolénico 150

Conclusiones 155

Bibliografía 161

Abreviaturas

$[Cl^-]_I$	Concentración de aniones de cloro intracelulares
5-HT	Serotonina (*5-Hidroxitriptamina*)
5-HIIA	Ácido 5-hidroxiindolacético
Aβ	β-amiloide (*Amyloid- β*)
AA	Ácido Araquidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFP	Alfafetoproteina
APP	Proteína precursora del β amiloide (*Amyloid Precursor Protein*)
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico (*Adenosine Monophosphate cyclic*)
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*)
BSA	Albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)
BrdU	5-Bromodesoxiuridina
CA1-3	Región CA1-3 del hipocampo (*Cornu Ammonis 1-3*)
CFC	Condicionamiento del miedo a un contexto (*Context Fear Conditioning*)
ChAT	Colinoacetiltransferasa (*Choline Acetyltransferase*)
CI	Coeficiente Intelectual
CLR	Calretinina
CO	Control euploide
DAB	3,3´Diaminobenzidina
DAPI	4´,6-Diamino-2-fenilindol diclorhidrato (*4´,6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride*).
DCX	Doblecortina *(Doublecortex)*
DG	Giro dentado (*Dentate Gyrus*)
DHA	Ácido Docosahexanoico
DSCR	Región Crítica del síndrome de Down (Down Syndrome Critical Region)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato (*Deoxynucleotide triphosphates*)
DPX	Resina sintética (*Distrene 80, Platicizer, Xylene*)
DYRK1A	*Dual Specificity Tyrosine-(Y)-Phosphorylation Regulated Kinase 1A*
EA	Enfermedad de Alzheimer
E.M.M.	Error estándar de la media

EPA	Ácido Eicosapentanoico
EGL	Capa granular externa *(External Granular Layer)*
EURL	*Early undifferentiated retina and lens*
GABA	Ácido gamma-aminobutírico *(Gamma-aminobutiric-acid)*
$GABA_A$	Receptor para GABA tipo A
$GABA_B$	Receptor para GABA tipo B
GAD	Glutamato descarboxilasa (*Glutamic Acid Decarboxylase*)
GAD65-67	Descarboxilasa del ácido glutámico *(Glutamic acid decarboylase 65-67)*
GAT	Transportador de GABA *(GABA Transporter)*
GCL	Capa granular *(Granular Cell Layer)*
GIRK2	Rectificador interno de potasio tipo 2 *(G protein-activated Inwardly Rectifying K^+ cannel subunit 2)*
HSA	Autosoma humano (*Humans sapiens autosome)*
H_2OmQ	Agua miliQ (H_2O miliQ)
i.p.	Vía intraperitoneal
IGL	Capa granular interna (*Internal Granular Layer)*
KCC2	Cotransportador $K^+/2CL^-$ isoforma 2
LTD	Depresión a largo plazo *(Long Term Depression)*
LTP	Potenciación a largo plazo (*Long Term Potentiation)*
PPRA	*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*
MAP-2	Proteínas Map kinasa 2
ML	Capa molecular (*Molecular Layer*)
MR	Medidas repetidas
MMU	Cromosoma murino (*Mus Musculus chromosome*)
MWM	Laberinto acuático de Morris (*Morris Water Maze*)
Mx1	Proteína de resistencia a mixovirus 1 *(MX dynamin like GTPase 1)*
NAM	Modulador alostérico negativo (*Negative Allosteric Modulator*)
NGF	Factor de crecimiento nervioso (*Nerve Growth Factor*)
NMDA	N-metil-D-aspartato
NKCC1	Cotransportador Na+/K+/2Cl- isoforma 1
OLIG1	*Olygodendrocyte transcription factor 1*

OLIG2	*Olygodendrocyte transcription factor 2*
P1	Día postnatal 1
P2	Día postnatal 2
PAM	Modulador alostérico positive *(Positive Allosteric Modulator)*
Pb	Pares de bases
PB	Tampón de fosfato sódico *(sodium phosphate buffer)*
PBS	Tampón fosfato salino *(phosphate buffered saline)*
PTZ	Pentilentetrazol
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real *(quantitative polymerase chain reaction)*
RAM	Laberinto radial (*Radial Arm Maze*)
RNA	Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)
r.p.m.	Revoluciones por minuto
s.c.	Vía subcutánea
SD	Síndrome de Down
SNC	Sistema nervioso central
SOD1	*Superoxide Dismutase 1*
SSADH	Succínico semialdehido deshidrogenasa (*Succinic semialdehyde dehydrogenase*)
SGZ	Zona Subgranular (*Subgranular Zone*)
Shh	*Sonic hedgehog*
THC	Tetrahidroxicurcumina

Introducción

1. El síndrome de Down

El síndrome de Down (SD), la aneuploidía autosómica humana más común, se produce por la presencia de una copia extra de una parte o de todos los genes ubicados en el cromosoma 21 humano (*Homo sapiens autosome 21*, HSA21; **figura 1**) (Dierssen et al., 2009). Esta aneuploidía tiene una prevalencia de 1 de cada 900-1000 nacimientos en Europa (Loane et al., 2013) y supone la causa más habitual de discapacidad intelectual congénita.

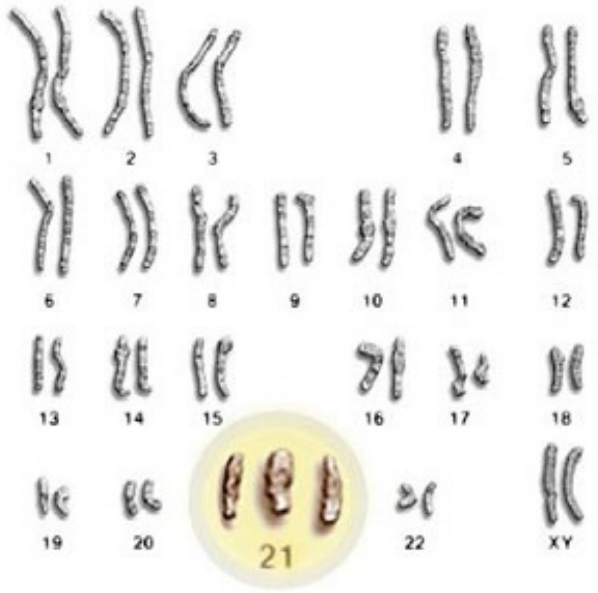

Figura 1. Cariotipo de un individuo con SD en el que se aprecian tres copias del HSA21. Modificada de https://www.downciclopedia.org/neurobiologia/genes-del-cromosoma-21.

1.1. Origen de la trisomía 21

Existen tres posibles causas que originan el SD, la más común (95 % de los casos) se debe a una no disyunción meiótica. Ésta se produce por una división celular anómala en la que el par de cromosomas 21, normalmente en el óvulo, no se separan correctamente, lo que origina una trisomía completa del HSA21 en todas las células del organismo. En el 4 % de los casos, se produce una translocación en la que una copia completa o parcial del HSA21 se une a otro cromosoma, originándose una trisomía parcial, ya que el número total de cromosomas en las células se mantiene en 46. Por último, en el 1 % restante se produce mosaicismo. En este caso la no disyunción se produce en las

primeras divisiones embrionarias y, por tanto, algunas células contendrán 46 cromosomas y otras 47.

1.2. El cromosoma 21 humano: descripción y relación con el SD

El HSA21 es el menor de los autosomas humanos y representa entre el 1 y el 1.5 % del genoma (Reeves, 2000). La secuencia completa del brazo largo del HSA21 (21q) se publicó en el año 2000 (Hattori et al., 2000) y la del brazo corto todavía no se conoce totalmente. Actualmente se estima que la longitud total de HSA21 es de 48.13 Mb y que contiene 242 genes que codifican para proteínas, 325 genes no codificantes y 153 pseudogenes.

Aunque está ampliamente admitido que los distintos fenotipos de las personas con SD son el resultado de la presencia de una copia adicional del HSA21, no está tan claro cuáles son los mecanismos moleculares por los cuales surgen estos fenotipos. Se han propuesto dos hipótesis que tratan de explicar los efectos causados por la presencia de un cromosoma adicional en los distintos fenotipos del SD: "la hipótesis de la dosis génica" (Delabar et al., 2006; Aït Yahya-Graison et al., 2007) y la "hipótesis de inestabilidad del desarrollo" (Pritchard y Kola, 1999; Shapiro, 2001; Roizen y Patterson, 2003). De acuerdo con la segunda hipótesis la presencia de un cromosoma supernumerario alteraría globalmente el equilibrio de expresión de genes en las células SD durante el desarrollo. Sin embargo, esta hipótesis no es apoyada por el hecho de que otros síndromes causados por trisomías autosómicas no producen el mismo cuadro clínico. Por otra parte, la correlación entre genotipo y fenotipo en pacientes con trisomías parciales apoya la hipótesis de la dosis génica, que postula que el fenotipo SD estaría causado por un exceso de dosis tanto de genes como de secuencias no codificantes (micro RNAs, secuencias reguladoras, etc.) contenidos en el HSA21. A estos dos mecanismos hay que añadir los efectos epistáticos causados sobre otros genes localizados en otros cromosomas (Sommer et al., 2008).

Se han realizado muchos esfuerzos para identificar los genes cuya sobreexpresión tiene un papel clave en los distintos fenotipos SD. Las herramientas más útiles para identificar genes candidatos han sido la caracterización citogenética y molecular de individuos con

trisomías parciales del HSA21 y la construcción de modelos murinos con trisomías parciales de diferentes regiones ortólogas al HSA21.

Otra estrategia empleada para la búsqueda de genes candidatos de la aparición de los distintos fenotipos SD consiste en realizar estudios de expresión diferencial de genes entre células o tejidos euploides y trisómicos, procedentes tanto de muestras humanas (Mao et al., 2005; Aït Yahya-Graison et al., 2007; Prandini et al., 2007), como de modelos murinos de SD (Kahlem et al., 2004; Lyle et al., 2004; Dauphinot et al., 2005; Sultan et al., 2007).

En base a todos estos estudios se han propuesto algunos genes candidatos que tendrían un papel crucial en las alteraciones del sistema nervioso central (SNC) presentes en las personas con SD (ver sección 1.4.2.), entre los que se encuentran los genes *DYRK1A* (dual specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A) (Kentrup et al., 1996;Guimera et al., 1999; Yang et al., 2001), *OLIG1* y *OLIG2* (Takebayashi et al., 2000; Zhou y Anderson, 2002; Lu et al., 2002;), *SOD1* (Jovanovic et al., 1998., Capone et al., 2002), *APP* (Amyloid Precursor Protein) (Isacson et al., 2002; Trazzi et al., 2011) y *EURL* entre otros (Li et al., 2016).

1.3. Características fenotípicas del SD

La presentación clínica del SD es compleja y variable. Unos pocos rasgos se manifiestan en mayor o menor grado en todos los individuos con trisomía 21, incluyendo la dismorfología facial, la reducción en el volumen y celularidad del cerebro y la aparición temprana de histopatología idéntica a la encontrada en la enfermedad de Alzheimer (EA). Todos los individuos con SD muestran un deterioro cognitivo, cuya severidad es altamente variable. Además, los recién nacidos con SD presentan frecuentemente hipotonía y muchos tienen dermatoglifos atípicos (Roper y Reeves, 2006).

La trisomía 21 es un factor de riesgo para desarrollar otro tipo de enfermedades como cardiopatías congénitas, que afectan a un 40-50 % de la población con SD (Roper y Reeves, 2006; Baraona et al., 2013), alteraciones del aparato disgestivo (Enríquez Zarabozo et al., 2010) o del sistema inmune y hematopoyético (Bloemers et al., 2010; Graber et al., 2012; Mårild et al., 2013). Además, son más frecuentes los trastornos

metabólico-hormonales en las personas con SD que en la población general (Regueras et al., 2011), así como una menor fertilidad e hipogonadismo en los varones con SD (Hsiang et al., 1987). Esta población también está más predispuesta a padecer problemas de obstrucción de las vías respiratorias y apnea del sueño, rinitis y sinusitis (Shott, 2006).

Las personas con SD presentan un perfil tumoral particular en comparación con la población general, con una mayor incidencia de leucemia en la infancia y un riesgo bajo de padecer cáncer sólidos en la edad adulta (Gamis y Smith, 2012).

Otras manifestaciones fenotípicas del SD son las alteraciones en el desarrollo del esqueleto, cuello corto (braquicefalia), alteraciones en las extremidades y dentadura anormal (Delabar et al., 2006).

A pesar de toda esta problemática patofisiológica, la esperanza de vida media de las personas con SD ha aumentado a más de 60 años en las últimas décadas debido a la aplicación sistemática de medidas terapéuticas de prevención y promoción de la salud, así como medidas de carácter corrector.

1.4. Neurobiología del SD

Las personas con SD presentan numerosas alteraciones en la estructura y función del SNC (Bartesaghi et al., 2011; Rueda et al., 2012) que son responsables de los déficits cognitivo-conductuales que manifiesta esta población. Algunas de las alteraciones neuroanatómicas y neuroquímicas asociadas al SD se producen en etapas tempranas del desarrollo y otras aparecen y progresan gradualmente durante el envejecimiento. A continuación se revisarán las bases funcionales, las características y las alteraciones del cerebro de las personas con SD que intervienen en los déficits cognitivos que presenta esta población.

1.1.1. Alteraciones en los sistemas cognitivos

La discapacidad intelectual es el rasgo más sobresaliente del SD. El coeficiente intelectual (CI) de una persona con SD varía entre 30 y 80, siendo la media en torno a 50. A partir de la adolescencia el CI comienza a declinar (Carr et al., 2014).

La discapacidad intelectual asociada al SD se caracteriza por un retraso del desarrollo del lenguaje, aprendizaje y memoria (Sella et al., 2013; Belacchi et al., 2014; Yoder et al., 2014), que se manifiesta en la dificultad de adquirir y estabilizar la información, retenerla y elaborar respuestas, así como por el bloqueo informativo, que dificulta que se procese la información presentada de forma rápida y agrupada (Flórez, 1999; Maltese et al., 2014).

Aprendizaje y memoria en las personas con SD

Los déficits de aprendizaje y memoria que presentan las personas con SD se producen por la alteración de varios procesos que se describen a continuación**.**

Memoria a corto plazo

En las personas con SD la memoria a corto plazo está especialmente dañada cuando se trata de manejar información auditiva (Nash y Heath, 2011), mientras que la visuoespacial está relativamente conservada (Visu-Petra et al., 2007; Lanfranchi et al., 2012). Las zonas cerebrales afectadas implicadas en la memoria a corto plazo son la corteza cingulada y la corteza prefrontal, las áreas de asociación auditiva y visual (lóbulo temporal superior e inferior), las zonas parietales posteriores y el hipocampo (Lott y Dierssen, 2010). Una modalidad de este tipo de memoria es la memoria de trabajo, que cumple las funciones de control, regulación y mantenimiento activo de información y es fundamental en las actividades cognitivas complejas diarias y en el desarrollo y ejecución de varias tareas de forma simultánea. Los jóvenes con SD tienen un déficit en el bucle fonológico (Baddeley y Jarrold, 2007) y en el sistema ejecutivo central (Lanfranchi et al., 2012) de la memoria de trabajo.

Memoria a largo plazo

La memoria a largo plazo es un sistema de memoria donde se almacena todo lo que conocemos acerca de nosotros y del mundo que nos rodea. En ella se integran la memoria explícita y la implícita o de procedimiento.

La memoria explícita o declarativa supone la capacidad de aprender intencional y conscientemente y requiere la codificación de la información adquirida, la consolidación

de la misma y la recuperación de los recuerdos, así como un alto grado de atención (Bartesaghi et al., 2011; Dierssen, 2012). Las personas con SD muestran un deterioro acusado en su memoria explícita, con una pobre codificación de la información, una capacidad de recuperación deteriorada y déficits de atención (Carlesimo et al., 1997; Vicari et al., 2000). Además, el proceso de consolidación también se encuentra afectado en el SD (Dierssen, 2012). Estos déficits son debidos a las alteraciones encontradas en ciertas áreas del cerebro como la corteza prefrontal y los lóbulos temporales, sobre todo el hipocampo (Lott y Dierssen, 2010; Hanslmayr et al., 2014). El hipocampo es un elemento integrador que recibe la información desde las áreas asociativas corticales y la transforma y consolida, mientras que la corteza prefrontal se encarga de almacenar la información, relacionarla y dotarla de significado.

La memoria implícita o procedimental maneja las habilidades o destrezas perceptivas, motoras y cognitivas adquiridas sin que exista una percepción consciente y sin requerir mucha atención, ya que opera de forma automática (Bussy et al., 2011). En el SD este tipo de memoria parece estar menos afectada que la explícita (Dierssen, 2012). Una de las estructuras que controla este tipo de aprendizaje es el estriado (Teichmann et al., 2006) que se encuentra bien conservado en el SD. En cambio, otras estructuras que también participan en la memoria implícita son el cerebelo y las áreas motoras del lóbulo frontal, ambas afectadas en el SD, lo que contribuye al deterioro de este tipo de memoria en esta población (Bussy et al., 2011).

Lenguaje y habla

El habla es uno de los dominios donde se encuentran las mayores dificultades de las personas con SD (Chapman, 2006), estando el lenguaje expresivo más dañado que el comprensivo (Ypsilanti et al., 2005).

A nivel cerebral, la desorganización estructural en las áreas de Broca y Wernicke y de las vías asociativas entre ambas da lugar a alteraciones en la capacidad codificadora del lenguaje (Young et al., 2001). Por otro lado, la hipoplasia cerebelar también puede influir en las dificultades articulatorias del habla (Pinter et al., 2001b).

Además, existen otros factores que influyen negativamente en el desarrollo y la adquisición del lenguaje, por ejemplo, la hipotonía de los músculos fonatorios y de la propia lengua y la pérdida de audición presente en un alto porcentaje de bebés y niños con SD (Roberts et al., 2007; Laws et al., 2014).

Por último, las alteraciones en la atención y las carencias en los sistemas de memoria a corto y largo plazo, así como de sus distintos subsistemas, pueden dificultar la retención y posterior evocación de las palabras (Jarrold et al., 2008), el aprendizaje de nuevo vocabulario y la capacidad de lectura (Nash y Heath, 2011; Purser y Jarrold, 2014).

1.4.1. Alteraciones morfológicas del SNC

Volumen encefálico reducido

Las personas con SD presentan menor volumen y peso del cerebro desde las etapas pre-natales (Guihard-Costa et al., 2006; Guidi et al., 2008; 2011). Sin embargo, no todas las áreas cerebrales están igualmente afectadas.

Durante la infancia el hipocampo y el cerebelo sufren un retraso en el desarrollo y una notable reducción en el tamaño (Schmid et al., 1992; Pinter et al., 2001a; Guidi et al., 2011). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en otras estructuras, la reducción del cerebelo no progresa con la edad (Aylward et al., 1997).

Durante la etapa adulta, la reducción del volumen y peso del cerebro se hacen aún más evidentes, siendo aproximadamente del 20 % (Jernigan et al., 1993; Pinter et al., 2001b). Diversos estudios de MRI demuestran que las regiones cerebrales más afectadas son los lóbulos frontal, parietal y temporal, siendo, en esta última, la estructura más afectada el hipocampo (Pinter et al., 2001b; Smigielska-Kuzia et al., 2010). El 50 % de los cerebros SD presentan hipoplasia en el opérculo y en la circunvolución temporal superior (Pinter et al., 2001b) e hipertrofia de la circunvolución parahipocámpica (Raz et al., 1995), del tronco del encéfalo (Pinter et al., 2001b) y del giro del cíngulo (Pinter et al., 2001b).

Estas anomalías se agravan aún más durante el envejecimiento debido a la atrofia de numerosas estructuras cerebrales (Teipel y Hampel, 2006). Los estudios de MRI en ancianos con SD no dementes han mostrado atrofia del lóbulo temporal medio, que

incluye el hipocampo, la amígdala (Kesslak et al., 1994; Krasuski et al., 2002) y áreas neocorticales como el cuerpo calloso, las cortezas parietal, frontal y occipital (Teipel et al., 2003; 2004). Estas alteraciones son similares a las encontradas en las etapas iniciales de la neuropatología tipo EA (Kesslak et al., 1994; Krasuski et al., 2002; Teipel et al., 2003; Teipel y Hampel, 2006).

Hipocelularidad y alteraciones en los procesos de neurogénesis

Las personas con SD presentan hipocelularidad en diversas áreas del SNC, lo que posteriormente influirá en la sinaptogénesis, conectividad neuronal, plasticidad sináptica y en las habilidades cognitivas.

La densidad neuronal en el hipocampo, el giro hipocampal, el cerebelo y el neocórtex de fetos (Larsen et al., 2008; Guidi et al., 2008; 2011) y neonatos con SD (Golden et al., 1994; Weitzdoerfer et al., 2001; Guidi et al., 2008) es menor. Además, esta hipocelularidad persiste en diferentes áreas del cerebro (Gandolfi et al., 1981) y cerebelo (Baxter et al., 2000) durante la niñez y la edad adulta.

Se ha propuesto que esta hipocelularidad es debida a las alteraciones que se producen en los procesos de neurogénesis desde etapas tempranas del neurodesarrollo. Así, la proliferación celular está alterada en fetos y en niños con SD en el giro dentado (*Dentate Gyrus*, DG) y el ventrículo lateral, en la corteza y, a nivel cerebelar, en la capa granular externa y en la zona ventricular (Contestabile et al. 2007, Larsen et al., 2008; Guidi et al., 2008; Guidi et al., 2011). En concreto, la copia extra de los genes contenidos en el HSA21 parece afectar al ciclo celular de los precursores neuronales durante el desarrollo (Kurabayashi et al., 2013; Chen et al., 2013) dando lugar a una ralentización del ciclo celular (Contestabile et al., 2007). Además, también se han observado alteraciones en los procesos de diferenciación neuronal (Bahn et al., 2002; Esposito et al., 2008).

Alteraciones en espinas, dendritas y en la conectividad sináptica

En el periodo fetal no se aprecian diferencias en la morfología dendrítica o en el número de espinas. Sin embargo, durante el primer año de vida se produce una reducción del

número de espinas dendríticas y una alteración en su morfología (Marin-Padilla, 1976; Vuksic et al., 2002).

Durante la infancia el número y tamaño de las dendritas y espinas dendríticas de las neuronas de la corteza motora, visual y parietal de las de las personas con SD está reducido (Takashima et al., 1981; Becker et al., 1986; Schulz y Scholz, 1992; Prinz et al., 1997).

En adultos con SD, la corteza visual y las áreas CA1 y CA3 del hipocampo presentan dendritas más cortas y arborizaciones dendríticas reducidas que progresivamente van degenerando (Suetsgugu y Mehraein, 1980; Takashima et al., 1994), al igual que ocurre con la densidad de espinas dendríticas (Takashima et al., 1989; Ferrer y Gullotta, 1990).

Por otro lado, los cerebros con SD también presentan alteraciones en la densidad sináptica, la longitud y el tamaño de las sinapsis (Scott et al., 1983; Wisniewski et al., 1986; Kaufmann et al., 2000; Kasai et al., 2003; Newpher et al., 2009).

Todas estas anomalías en espinas y dendritas y en las características y distribución de las sinapsis se producen a lo largo del desarrollo y dan lugar a una red de conexiones neurales anormal que limita el procesamiento de la información, disminuye la plasticidad sináptica e influye en la aparición y progreso del déficit cognitivo característico del SD (Williams et al., 2005; Wishart, 2007; Lott y Dierssen, 2010).

1.4.2. Alteraciones neuroquímicas

Las personas con SD también presentan numerosas alteraciones en los distintos sistemas de neurotransmisión y en la expresión y función de sus receptores. Estas alteraciones influyen en los déficits en la neurogénesis, la transmisión sináptica y la cognición observados en esta población.

El **sistema colinérgico** está alterado en el cerebro de fetos (Whittle et al., 2007) y adultos con SD (Godridge et al., 1987; Risser et al., 1997), aunque es durante el envejecimiento cuando este sistema sufre una mayor degeneración (Schliebs y Arendt, 2011).

El **sistema serotoninérgico** también se encuentra alterado en personas con SD. La serotonina (*5-Hidroxitriptamina*, 5-HT) y sus receptores ejercen un papel importante en la neurogénesis, diferenciación neuronal, desarrollo dendrítico, la mielinización de los axones y la sinaptogénesis (Whitaker-Azmitia, 2001). Las personas con SD presentan menores niveles de 5-HT y un menor número de receptores 5-HT_{1A} en estadios fetales y adultos (Malberg et al., 2000; Santarelli et al., 2003; Encinas et al., 2006; Whittle et al., 2007).

El **sistema noradrenérgico** desempeña un papel fundamental, modulando desde el *locus coeruleus* la actividad del hipocampo (Trillo et al., 2013). Así, interviene en la adquisición, codificación y recuperación de la memoria contextual (Sara, 2009) y participa en los procesos de neurogénesis (Duman et al., 2001). El SD se caracteriza por una degeneración dependiente de la edad de este sistema, en fetos con SD los niveles de noradrenalina son normales (Whittle et al., 2007) mientras que están reducidos en los cerebros adultos con SD (Risser et al., 1997).

El **sistema GABAérgico** está compuesto por interneuronas GABAérgicas que generalmente ejercen un control inhibidor sobre las células piramidales del hipocampo (Freund y Buzsaki, 1996) y por neuronas GABAérgicas que se proyectan desde el septum lateral y llevan a cabo su función inhibidora sobre el hipocampo. Se ha descrito una disminución de los niveles del neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA) fetos (Whittle et al., 2007; Smigielska-Kuzia y Sobaniec, 2007) y en adultos con SD y EA, probablemente debida a la degeneración de todo tipo de poblaciones neuronales (Reynolds y Warner, 1988).

El **sistema glutamatérgico** también está afectado en el SD, pero principalmente tras la aparición de la neuropatología típica de la EA. Aunque los estudios realizados en fetos con SD han descrito niveles normales de glutamato (Sairanen et al., 2005), diversas áreas del cerebro adulto muestran niveles bajos de los neurotransmisores aspartato y glutamato (Godridge et al., 1987; Risser et al., 1997; Schneider et al., 1997).

Por otro lado los factores neurotróficos o **neurotrofinas** tienen un papel crucial en la formación, mantenimiento y la diferenciación de las neuronas del SNC. Entre sus funciones más importante se incluyen la regulación de la neurogénesis, diferenciación

neuronal, migración celular, el crecimiento de axones y dendritas, la sinaptogénesis y la mielinización (Snider, 1994; Chan et al., 2001). Los estudios realizados en fetos con SD han puesto de manifiesto una expresión reducida del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en hipocampo y corteza cerebral y del (Guedj et al., 2009; Toiber et al., 2010).

Además de las alteraciones en los sistemas de neurotransmisión mencionados, se han hallado niveles reducidos de taurina, dopamina e histamina en distintas áreas del cerebro de fetos y adultos con SD (Yates et al., 1986; Godridge et al., 1987; Wisniewski y Bobinski, 1991; Risser et al., 1997; Schneider et al., 1997; Whittle et al., 2007).

1.4.3. Alteraciones en procesos que agravan la neurodegeneración

Durante la etapa adulta, las personas con SD muestran un envejecimiento acelerado del cerebro (Beacher et al., 2010) y presentan una **neuropatología similar a la encontrada en la EA** (Di Domenico et al., 2013).

De manera similar a lo que ocurre en la EA, en el SD se produce una atrofia en distintas áreas cerebrales (Fox et al., 2001; Beacher et al., 2009), formación de placas amiloides debido a los depósitos extracelulares de péptidos β-amiloides (Aβ) y de ovillos neurofibrilares intraneuronales de la proteína tau hiperfosforilada (Holtzman et al., 1996; Cataldo et al., 2008). Por último, las personas con SD también presentan una agravación del estrés oxidativo (Busciglio et al., 2007; Zigman y Lott, 2007; Perluigi y Butterfield, 2011; 2012; Di Domenico et al., 2013; Valenti et al., 2014) y de los procesos neuroinflamatorios (Griffin et al., 1989; Wenk et al., 2000; Wilcock y Griffin, 2013) que juegan un importante papel en la etiopatología de la EA.

1. El sistema GABAérgico y su implicación en el síndrome de Down

Como ya se mencionó, GABA es el principal neurotransmisor inhibidor del SNC. Este aminoácido es sintetizado a partir del ácido glutámico, gracias a la acción de las enzimas glutamato descarboxilasa (*Glutamic Acid Decarboxylase*, GAD) GAD 67 y GAD 65 (Pinal y Tobin, 1998). Una vez sintetizado, los transportadores vesiculares de GABA (*Vesicular GABA Transporter*, VGAT) empaquetan al neurotransmisor en vesículas que serán

secretadas en la hendidura sináptica como consecuencia de la llegada de un potencial de acción. GABA actúa principalmente sobre los receptores ionotrópicos (canales de Cl^- dependientes de ligando) $GABA_A$ y sobre los receptores metabotrópicos (acoplados a proteínas G) $GABA_B$ (Potier et al., 2014). La recaptación del GABA en las sinapsis, y con ello el cese de la actividad del neurotransmisor sobre el receptor, es llevada a cabo por transportadores de GABA situados en la membrana celular (*GABA Transporters*, GATs). Por último, la degradación del neurotransmisor es realizada por las enzimas GABA transaminasa (GABA-T) y succínico semialdehido deshidrogenasa (*Succinic Semialdehyde Dehydrogenase*, SSADH) que convierten GABA en intermedios del ciclo de Krebs y sustratos para la nueva producción de glutamato (Deidda et al., 2014).

Se ha propuesto que la sobreinhibición producida por la actividad excesiva del sistema GABAérgico podría ser uno de los mecanismos subyacentes a los déficits cognitivos presentes en el SD. Sin embargo, diversos estudios no apreciaron cambios significativos en los niveles de GABA cerebrales de adultos con SD sin EA con respecto a los de la población normal de la misma edad (ver Martínez-Cué et al., 2014). Aunque los niveles de GABA no se encuentran alterados en jóvenes o adultos con SD sí que existe un desequilibrio entre la neurotransmisión excitadora e inhibidora, siendo esta última mayor que la primera y, por tanto, dando lugar a una sobre-inhibición (Risser et al., 1997; Reynolds y Warner, 1988; Seidl et al., 2001).

Por otro lado, el GABA también está implicado en el proceso de neurogénesis adulta. En primer lugar, durante la proliferación, los neuroblastos liberan GABA que juega un importante papel en el control del número adecuado de progenitores neuronales (Nguyen et al., 2003). Además, durante la fase de migración el aumento de la concentración de GABA reduce la tasa de migración de los neuroblastos. Por último, GABA es esencial para el desarrollo e integración de las sinapsis dendríticas de las células granulares del hipocampo (Ge et al., 2006; Earnheart et al., 2007, Ge et al., 2007). Por tanto, el desequilibrio entre la actividad de neurotransmisores excitadores e inhibidores encontrados en el SD podría ser uno de los factores que alteran la neurogénesis en este síndrome.

1.5. El receptor $GABA_A$

Los receptores $GABA_A$ forman un canal de cloro que permite el paso hacia el interior de la neurona al anión Cl^- a favor de gradiente, provocando un cambio en el potencial de membrana.

Este receptor $GABA_A$ es una estructura formada por cinco subunidades codificadas por 19 genes diferentes que a su vez se distinguen en ocho subclases según sea la homología de sus secuencias: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ, ε, π, θ y ρ 1-3, dando lugar a al menos 36 subtipos distintos de receptores $GABA_A$ en las neuronas del SNC (Olsen y Sieghart, 2008; Fritschy y Panzanelli, 2014; **figura 2**). Esta diversidad confiere a cada uno de los receptores diferentes características estructurales, funcionales y de localización en distintas zonas del SNC (Olsen y Sieghart, 2008; Rudolph y Möhler, 2013). Esta heterogeneidad estructural también determina su posición y actividad en la sinapsis. Aquellos receptores $GABA_A$ compuestos por las subunidades α1, α2 y α3 asociadas a la subunidad γ2 son receptores postsinápticos con respuestas **fásicas**. Es decir, respuestas rápidas, de corta duración, que se generan por la activación con altas concentraciones de GABA liberado en la sinapsis de los receptores $GABA_A$ de baja afinidad. Por otro lado, los receptores que contienen las subunidades α4, α5, α6 y δ son receptores extrasinápticos con respuestas **tónicas**, respuestas de mayor duración mediadas por receptores $GABA_A$ de alta afinidad que se activan con concentraciones bajas de GABA ambiental (Banks y Pearce, 2000; Glykys y Mody, 2006; Brickley y Mody, 2012).

Se ha demostrado que la subunidad α5 del receptor $GABA_A$ está implicada en los procesos de memoria y aprendizaje (Mohler et al., 1996; Rudolph y Möhler, 2006). Los receptores que contienen esta subunidad ($GABA_A$α5) están localizados fundamentalmente en la base de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. Es decir, son receptores extrasinápticos que median la inhibición tónica (Möhler, 2007; Yamada et al., 2007; Olsen y Sieghart, 2009).

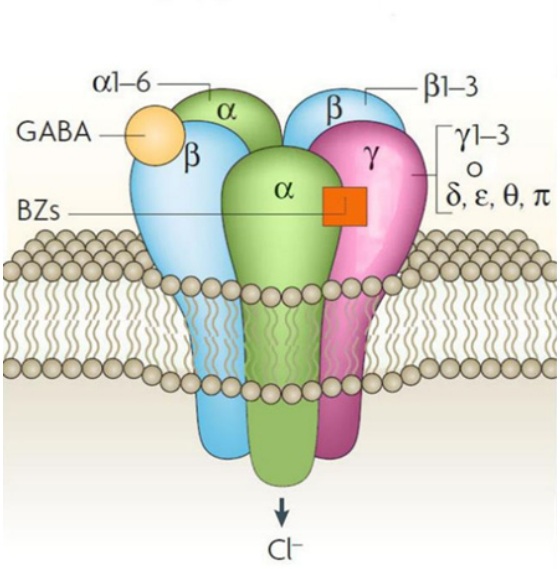

Figura 2: Estructura del receptor $GABA_A$. Cinco subunidades de siete subfamilias de subunidades (α, β, γ, δ, ε, θ, π) se ensamblan para formar un canal de cloro permeable. La mayoría de los receptores $GABA_A$ expresados en el cerebro consisten en 2 subunidades α, 2 β, y 1 subunidad γ que puede ser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

1.5.1. Farmacoterapia dirigida a los receptores $GABA_A$α5

Es bien conocido el papel del receptor $GABA_A$ en los procesos cognitivos. La administración de antagonistas de este receptor, como la bicuculina, la picrotoxina o el pentilentetrazol (PTZ), mejoran la memoria dependiente del hipocampo en un modelo animal de SD, el ratón Ts65Dn, que se describirá en el apartado 5 (Kleschevnikov et al., 2004; Fernandez et al., 2007; Rueda et al., 2008; Colas et al., 2013). Además, la administración de moduladores alostéricos negativos (*Negative Allosteric Modulators*, NAMs) no selectivos de este receptor, que actúan sobre todos los receptores $GABA_A$ independientemente de las subunidades que los conformen, mejora los procesos cognitivos tanto en humanos con amnesia post-anestesia, como en modelos animales con diferentes sensibilidades para los moduladores pero sin déficits cognitivos (Jensen et al., 1987; Venault et al., 1987 Sarter et al., 2001; Venault y Chapouthier, 2007). Por otro lado, la administración de moduladores alostéricos positivos (*Positive Allosteric Modulators*, PAMs) no selectivos del receptor $GABA_A$, deteriora los procesos de

aprendizaje y memoria en personas sanas (Lister, 1985; Cole, 1986; Ghoneim y Mewaldt, 1990).

Sin embargo, tanto los NAMs como los antagonistas no selectivos del receptor $GABA_A$ incrementan la ansiedad y la probabilidad de sufrir convulsiones, por lo que este tipo de compuestos no es adecuado para el tratamiento de los déficits cognitivos (Wetmore y Garner, 2010).

Por otro lado, los estudios con ratones a los que se les había bloqueado genéticamente la subunidad $GABA_A\alpha5$ demostraron la implicación selectiva de esta subunidad en procesos cognitivos, ya que estos ratones mostraban una mejor memoria y aprendizaje sin cambios en los niveles de ansiedad o en la aparición convulsiones (Collinson et al., 2002; Crestani et al., 2002; Yee et al., 2004). Estos resultados, junto a la expresión selectiva en el hipocampo de esta subunidad, sugirieron que los NAMs selectivos para $GABA_A\alpha5$ producirían efectos pro-cognitivos sin inducir los efectos adversos de los compuestos no selectivos.

El primer NAM con una afinidad preferente por los receptores $GABA_A\alpha5$ que se desarrolló fue L-655 708. La administración de este compuesto incrementa la potenciación hipocampal a largo plazo (*Long term potenciación,* LTP) y la memoria en ratones normales sin producir convulsiones (Navarro et al., 2002; Glykys et al., 2008; Atack, 2011). Sin embargo, la administración de L-655 708 sí que produce un efecto ansiogénico, probablemente por su actividad sobre otras subunidades además de las α5 (Atack, 2011).

Posteriormente, la farmacéutica Merck diseño un NAM con una eficacia más alta para la subunidad α5 en comparación con la subunidad α1 y que se comportaba como un débil modulador alostérico positivo de las subunidades α2 y α3 (Sternfeld et al., 2004; Potier et al., 2014). Este modulador, llamado α5IA, mejora la cognición en el modelo murino de SD Ts65Dn, sin producir ansiedad o provocar convulsiones (Potier et al., 2014). Sin embargo, una posible toxicidad renal impidió su desarrollo clínico (Merschman et al., 2005).

Por último, Hoffmann-La Roche desarrolló el compuesto RO4938581 (**figura 3**), un potente NAM de los receptores $GABA_A\alpha5$ (Knust et al., 2009) con una mayor afinidad por los receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5 que por los que contienen las subunidades α1, α2, α3. Su selectividad, tanto funcional como de afinidad, le convierte en un fármaco con un perfil ideal para mejorar la cognición sin producir los efectos secundarios relacionados con la actividad de otras subunidades del receptor $GABA_A$.

El tratamiento con este fármaco mejora la cognición de monos, ratas y ratones sin provocar ansiedad ni incrementar la probabilidad de padecer convulsiones (Ballard et al., 2009). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la administración crónica de RO4938581 durante 12 semanas tiene efectos pro-cognitivos, mejora la neurogénesis y la LTP en el ratón Ts65Dn (Martínez-Cué et al., 2013). El estudio I de esta tesis evalúa los efectos de diferentes pautas de administración de este fármaco, con el objetivo de analizar si tras la interrupción del tratamiento con RO4938581 los cambios neuroquímicos y neuroanatómicos se mantienen a largo plazo.

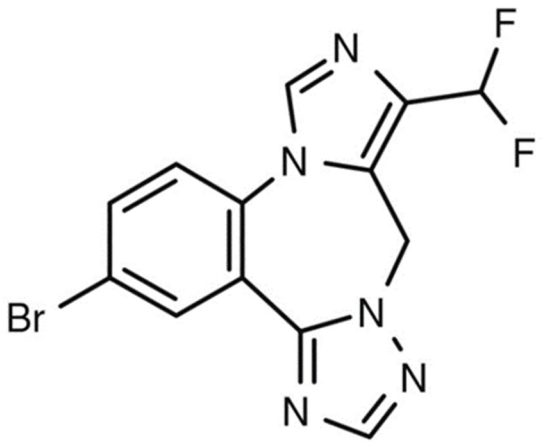

Figura 3: Estructura de RO4938581 (3-bromo-10-(difluorometil)-9H-imidazo [1,5-a] [1, 2,4] triazolo [1,5-d] [1,4] benzodiacepina).

2. Papel neuroprotector de los ácidos oleico y linolénico

Durante el desarrollo fetal los ácidos grasos tienen un papel fundamental en la morfogénesis y desarrollo del cerebro. Por ello, se produce un aumento de sus niveles durante el periodo de gestación y una disminución progresiva durante el primer trimestre después del nacimiento. Se ha demostrado que existe una asociación directa entre el porcentaje de ácidos grasos en el plasma materno y el desarrollo de las funciones cognitivas del neonato (Gil-Sánchez et al., 2012). Además, el aporte adicional pre- y post-natal de ácidos grasos incrementa el desarrollo del cerebro tanto en animales como en humanos (Gaete et al., 2002).

2.1. Ácido oleico

Síntesis y mecanismo de acción del ácido oleico

El ácido oleico (**figura 4**) es un ácido graso monoinsaturado de la serie Ω9. Se encuentra presente de manera endógena en el organismo y en la naturaleza en los aceites vegetales, por lo que puede consumirse fácilmente en la dieta de manera habitual.

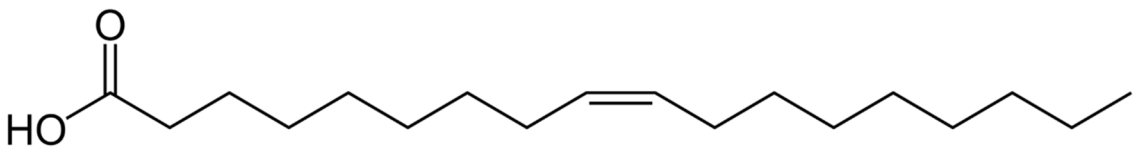

Figura 4. Estructura del ácido oleico. https://educacionquimica.wordpress.com/2011/12/26/efectos-beneficiosos-de-los-compuestos-quimicos/

El ácido oleico se sintetiza y se libera desde los astrocitos al espacio extracelular donde actúa como factor neurotrófico en las neuronas (Tabernero et al., 2001).

En las neuronas, el ácido oleico induce la expresión de genes tras unirse a su receptor PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor), la proteína kinasa A (PKA) y el factor neuroD2 (Rodríguez-Rodríguez et al., 2004; Bento-Abreu et al., 2007; Polo-Hernández et al., 2014).

Papel neuroprotector del ácido oleico

En mamíferos gran parte del desarrollo cerebral, particularmente la diferenciación neuronal, ocurre durante el periodo postnatal. El ácido oleico juega un papel fundamental actuando como factor neurotrófico para promover el desarrollo del cerebro durante las primeras etapas de la vida.

Estudios *in vitro* han demostrado que el ácido oleico induce la diferenciación neuronal. Cuando es captado por las neuronas participa en la síntesis de fosfolípidos que se incorporan en los conos de crecimiento neuronal (Medina y Tabernero, 2002). Así, promueve la elongación de los axones y el contacto de unas neuronas con otras (Tabernero et al., 2001; Medina y Tabernero, 2002), favoreciendo la formación de los circuitos neuronales. Además, la presencia del complejo ácido oleico-albumina produce un incremento de las proteínas de diferenciación neuronal MAP-2 y GAP-43, implicadas en el crecimiento dendrítico y axonal respectivamente (Rodríguez-Rodríguez et al., 2004; Shi et al., 2012).

El ácido oleico también promueve el crecimiento de neuritas (Polo-Hernández et al., 2014), la migración neuronal (Tabernero et al., 2001; Medina y Tabernero, 2002) y la formación de sinapsis en cultivos primarios de neuronas de rata (Polo-Hernández et al., 2014). Además, aumenta la expresión de la doblecortina (DXC), una proteína implicada en la diferenciación y migración neuronal, y promueve la síntesis de las proteínas pre- y post-sinápticas sinaptotagmina y PSD95, que están implicadas en la generación de la LTP (Stein et al., 2003), en cultivos de neuronas de cerebros de ratas en desarrollo (Polo-Hernández et al., 2014).

Estudios *in vivo* realizados en cerebros de rata han demostrado que los niveles de albúmina y ácido oleico aumentan después del nacimiento y que este evento se acompaña de un aumento en el factor de diferenciación neuronal GAP-43 (Velasco et al., 2003; Polo-Hernandez et al., 2010). Estos resultados sugieren que el ácido oleico actúa como factor neurotrófico durante el desarrollo del cerebro en etapas postnatales en estos animales. Además, el ácido oleico promueve la formación de axones en el estriado durante el desarrollo del cerebro (Polo-Hernández et al., 2010).

Por otro lado, la administración de oleoiletanolamida, un derivado del ácido oleico, activa la transmisión noradrenérgica en el complejo basolateral de la amígdala y mejora la memoria espacial y la memoria asociativa en ratas (Campolongo et al., 2009).

En el SD los niveles de ácidos grasos monoinsaturados en los fosfolípidos cerebrales son menores (Shah, 1979). Por otro lado, en cultivos de neuronas corticales de un modelo murino de SD, el ratón Ts16, los efectos neurotróficos del ácido oleico sobre la expresión de la enzima ChAT (colinoacetiltransferasa), un marcador de la diferenciación de neuronas colinérgicas, son menores (Hijazi et al., 2013). Por tanto, la menor cantidad de ácidos grasos monoinsaturados en el cerebro SD podría ser responsable algunas de sus alteraciones neuromorfológicas y cognitivas.

2.2. Ácido linolénico

Síntesis

El ácido α-linolénico es un ácido graso poliinsaturado esencial de la serie Ω3. Es un componente de muchos aceites vegetales y está presente en cantidades elevadas en el pescado y en organismos marinos que se alimentan de fitoplancton. Tras su incorporación al organismo, sufre una serie de elongaciones que dan lugar a moléculas esenciales como el ácido Docosahexaenoico (DHA), el derivado a través del cual ejerce la mayor parte de sus efectos neuroprotectores y pro-cognitivos, y el ácido eicosapentaenoico (EPA), una molécula con propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras (Jannsen et al., 2014).

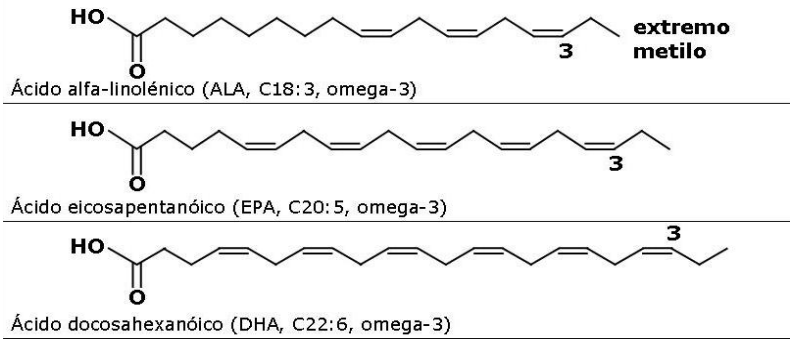

Figura 5. Estructura del ácido linolénico y sus derivados esenciales de la serie Ω3, EPA y DHA. Imagen modificada de http://lunchanddinner.es/acidos-grasos-omega-mito-o-realidad/.

Las células endoteliales y astrogliales del cerebro son las encargadas de llevar a cabo la síntesis de DHA. Sin embargo, la cantidad que sintetizan no es suficiente para cumplir los requerimientos bioquímicos neuronales, por lo que es necesario un aporte de su precursor, el ácido linolénico, a través de la dieta (Hashimoto et al., 2016).

Papel neuroprotector del ácido linolénico y del DHA

El déficit de ácido linolénico puede afectar a la función neuronal y al correcto funcionamiento del cerebro (Yehuda et al., 1997). Debido a su estructura química, la incorporación del DHA en la membrana, produce una disminución del punto de fusión proporcionando mayor fluidez y flexibilidad (Hashimoto et al., 2016), lo que puede influir en la neurotransmisión (Clarke et al., 1999). Si las membranas de las células nerviosas se vuelven demasiado rígidas, los receptores se vuelven menos capaces de reconocer los neurotransmisores y de transmitir las señales.

El ácido linolénico y el DHA promueven la neurogénesis (Lei et al., 2013) y la posterior diferenciación de los progenitores neurales *in vivo* e *in vitro* (Kawakita et al., 2006; Hashimoto et al., 2016;). En cultivos de neuroesferas de células madre neurales de cerebros de embriones de rata, el ácido linolénico aumenta la proliferación y la posterior diferenciación de los progenitores neurales mediante la inducción de diferentes factores de transcripción (Katura et al., 2009; Hashimoto et al., 2016).

Varios estudios realizados en roedores demuestran los beneficios de la suplementación con ácido linolénico y ácidos Ω3 en la dieta de hembras gestantes sobre la neurogénesis en el cerebro de sus crías (Chalon et al., 1998; Coti et al., 2006; Cao et al., 2009; Cutuli, 2016; Tang et al., 2016). Por el contrario, su deficiencia en la dieta materna reduce el número de células proliferativas en el DG de crías de rata (Coti et al., 2006; Tang et al., 2016). Además, la suplementación de DHA o de ácido linolénico aumenta la neurogénesis de ratas y ratones adultos (Kawakita et al., 2006; Hashimoto et al., 2016).

Por otro lado, tanto en etapas tempranas del desarrollo como durante la edad adulta, la administración de ácido linolénico aumenta el crecimiento de neuritas (Robson et al., 2010) y la sinaptogénesis (Tixier-Vidal et al., 1986; Wurtman et al., 2006). El aporte de DHA también aumenta los niveles de factores de señalización implicados en el desarrollo

de espinas y sinapsis (Kim et al., 2011; Rashid et al., 2013; Cutuli, 2016). Además, el aporte de DHA mejora la cognición y la memoria espacial aumentando los niveles de BDNF y TrkB en el hipocampo de modelos murinos de EA (Lee et al., 2016) y en las crías de ratas suplementadas con ácido linolénico durante la gestación (Bhatia et al., 2011).

Además, la administración de DHA durante 12 semanas a ratas de 5 semanas de edad mejora su memoria espacial y promueve la expresión de genes, como *c-fos*, que participan en procesos de plasticidad neuronal, aprendizaje y memoria en el hipocampo (Tanabe et al., 2004). El DHA también aumenta la LTP en la corteza y el hipocampo de rata (Nishikawa et al., 1994; Fujita et al., 2001).

El ácido linolénico también ejerce efectos neuroprotectores gracias a su alto poder antioxidante y antiinflamatorio (Hossains et al., 1999; Bazan et al., 2007; McNamara et al., 2010; Casañas-Sanchéz et al., 2015; Lee et al., 2016; Cutuli et al., 2016; Hashimoto et al., 2016).

Por último, se han realizado estudios que ponen de manifiesto el potencial terapéutico del ácido linolénico en el SD. El tratamiento con una dieta suplementada con aceite de pescado que contenía ácido linolénico fue capaz de rescatar los déficits cognitivos en ratones que sobreexpresan el gen de la calcineurina 1 (*RCAN-1*), un gen sobreexpresado en el SD, que interviene en el crecimiento de neuritas, la LTP, la defosforilación de la proteína tau y la liberación de neurotransmisores (Zmijewski et al., 2015). Por otro lado, la administración durante 6 meses de una mezcla que contenía polifenoles de té verde y aceite de pescado rico en ácido linolénico, mejoró la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en linfocitos, así como la puntuación obtenida en diversas pruebas que requerían atención y/o concentración en un niño con SD (Vacca et al., 2015).

3. Curcumina

Características, transporte y metabolismo

La curcumina (*diferuloilmetano*) es un producto químico fenólico aislado a partir de los rizomas de la planta *Curcuma longa* (cúrcuma).

Además de su consumo en la dieta, la cúrcuma se ha usado tradicionalmente para el tratamiento de varias enfermedades como la psoriasis, los eczemas y las dolencias del tracto digestivo (Ullah et al., 2017). Diversos estudios preclínicos han demostrado su potencial terapéutico en varias patologías del sistema inmune, diferentes tipos de cáncer, enfermedades inflamatorias y cardiovasculares y trastornos neurológicos y neurodegenerativos (Darvesh et al., 2012; Seo et al., 2015; Di Martino et al., 2017; Ullah et al., 2017).

Debido a su baja hidrosolubilidad se transporta y distribuye en el organismo unida a la albúmina (Burgos-Moron et al., 2010). Tras incorporarse y metabolizarse, da lugar a glucurónidos de curcumina y a tetrahidroxicurcumina (THC) (Pan et al., 1999; Ullah et al., 2017). Tanto la curcumina como sus derivados son capaces de atravesar la barrera placentaria (Ganiger et al., 2006) y la hematoencéfalica (Darvesh et al., 2012; Ullah et al., 2017). Sin embargo, la curcumina se degrada y elimina rápidamente (Darvesh et al., 2010; et al., 2012; Mytrhi et al., 2012; Ullah et al., 2017). Hay evidencias de que sus efectos positivos podrían ser debidos a algunos de sus metabolitos, especialmente a la THC.

Papel neuroprotector de la curcumina

La curcumina es una molécula con múltiples funciones entre las que destacan sus efectos antiinflamatorios, antioxidantes e inmunomoduladores (Seo et al., 2015).

Uno de sus principales efectos neuroprotectores es la estimulación de la proliferación celular (Xu et al., 2007; Kim et al., 2008; Darvesh et al., 2012; Nam et al., 2014). La curcumina estimula la proliferación en cultivos de progenitores neurales embrionarios y la neurogénesis en el hipocampo de ratones y ratas adultos (Kang et al., 2006; Kim et al., 2008; Berberoglu et al., 2009). Además, también promueve la diferenciación neuronal *in vitro* (Liao et al., 2012) e *in vivo* en ratas con isquemia cerebral (Liu et al., 2016) y en modelos murinos de EA (Darvesh et al., 2012; Dang et al., 2013; Tiwari et al., 2014; Nam et al., 2014).

Por otro lado, la curcumina mejora la LTP hipocampal (Cheng et al., 2013) y la transmisión sináptica en ratones jóvenes y viejos (Dong et al., 2012; Cheng et al., 2013).

La curcumina también ejerce acciones antioxidantes y antiinflamatorias (Darvesh et al., 2012; Pluta et al., 2015; Mohajeri et al., 2015., Ullah et al., 2017), reduce la formación de placas β-amiloides, la fosforilación de la proteína tau y previene el deterioro cognitivo asociado a la EA (Ullah et al., 2017).

Por último, mejora los procesos de memoria y aprendizaje en humanos y en varios modelos murinos (Ng et al., 2006; Dong et al., 2012; Nam et al., 2014; Qi et al., 2017).

4. Modelos murinos de síndrome de Down

Una de las estrategias más utilizadas para identificar los mecanismos biológicos subyacentes a las alteraciones fenotípicas encontradas en el SD y para evaluar la eficacia de nuevas terapias es el desarrollo de modelos animales.

El brazo largo del HSA21 contiene aproximadamente 552 genes de los cuales 166 son ortólogos a genes localizados en regiones sinténicas de tres cromosomas murinos: MMU16 (110 genes ortólogos), MMU17 (19 genes ortólogos) y MMU10 (37 genes ortólogos) (Sturgeon y Gardiner, 2011). Basándose en estas homologías, se han desarrollado varios modelos murinos trisómicos para diferentes grupos de genes del HSA21. A pesar de que existen varios modelos murinos para el estudio del SD (Rueda et al., 2012), se describirá únicamente el ratón Ts65Dn, ya que es el modelo utilizado en esta tesis.

4.1. El ratón Ts65Dn como modelo de síndrome de Down

El ratón Ts65Dn (TS) es actualmente el modelo más comúnmente utilizado y mejor caracterizado para el estudio del SD. Este modelo tiene una trisomía parcial del segmento del MMU16 que se extiende entre los genes *Mrp139* y *Znf295* y que contiene aproximadamente 92 genes ortólogos al HSA21 (Sturgeon y Gardiner, 2011; **figura 6**). Los ratones TS también portan una trisomía del MMU17 de aproximadamente 10 Mb que contiene 60 genes no-homólogos al HSA21 (Duchon et al., 2011). A pesar de que en este modelo bastantes genes ortólogos al HSA21 no están triplicados y hay un grupo de genes euploides en el SD que están en trisomía en este ratón, el ratón Ts65Dn es actualmente el modelo que presenta más rasgos fenotípicos del SD.

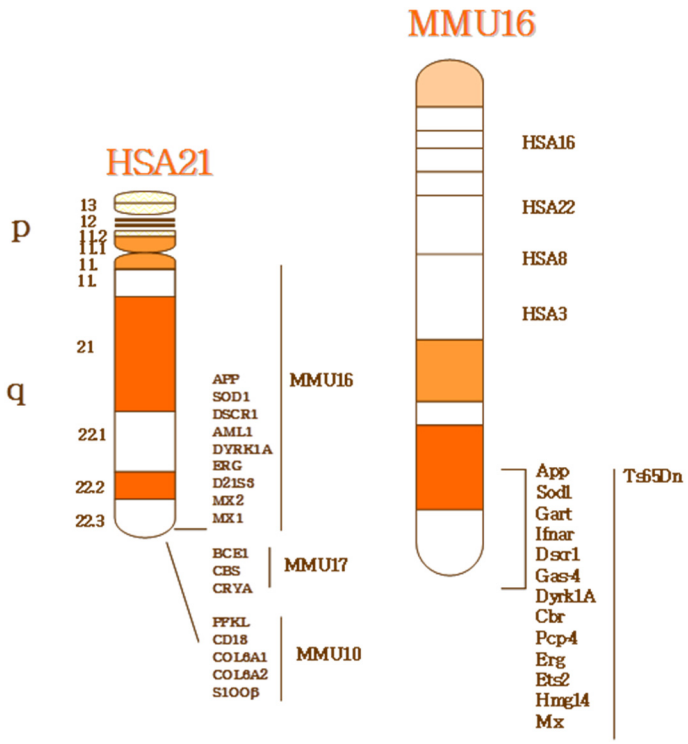

Figura 6. Representación esquemática del cromosoma 21 humano (HSA21) y del cromosoma 16 de ratón (MMU16). Se indican las regiones sinténicas entre estos dos cromosomas, así como con otros cromosomas. También se señala la región que está triplicada en el ratón Ts65Dn.

A continuación, se describirán en detalle la neurobiología y las alteraciones cognitivo-conductuales de este modelo que también están presentes en el SD (**tabla 1**).

4.1.1. Alteraciones neuromorfológicas

Volumen encefálico reducido e hipocelularidad

El tamaño y volumen cerebral del ratón TS es menor durante el periodo embrionario, pero no después del nacimiento o durante la edad adulta (Aldridge et al., 2007; Chakrabarti et al., 2007). Sin embargo, algunas estructuras encefálicas como el hipocampo o el cerebelo sí presentan un volumen reducido durante la edad adulta (Baxter et al., 2000; Lorenzi et al., 2006; Bianchi et al., 2010a; 2010b).

Esta reducción de volumen de distintas áreas encefálicas está relacionada con una menor densidad celular, tal y como ocurre en las personas con SD. Concretamente, los ratones TS presentan un menor tamaño de la capa de células granulares (GCL) del hipocampo y del hilus y de algunas capas neocorticales (Chakrabarti et al., 2007;

Contestabile et al., 2008; Rueda et al., 2010; Llorens-Martín et al., 2010). El número de neuronas en las áreas CA1-CA3 del hipocampo es normal durante los primeros meses de vida (Lorenzi y Reeves, 2006), sin embargo, a los 17-18 meses disminuye en CA1 (Insausti et al., 1998). Además, en el cerebelo el número de células granulares y de Purkinje es menor desde estadíos post-natales tempranos hasta la edad adulta (Baxter et al., 2000; Roper et al., 2006a; Contestabile et al., 2006).

De manera similar a lo que ocurre en el SD (Risser et al., 1997), diversos estudios han demostrado un deterioro del sistema colinérgico dependiente de la edad en el ratón TS. A partir de los 6 meses de edad, los ratones TS muestran una pérdida de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, así como una disminución del tamaño de los somas de estas neuronas (Granholm et al., 2000; Hunter et al., 2003).

Esta hipocelularidad parece ser una de las causas de la discapacidad intelectual en la condición trisómica y podría estar causada por un deterioro en los procesos de neurogénesis, un aumento de la apoptosis y/o de la neurodegeneración.

4.1.2. Alteraciones en la neurogénesis

Al igual que en el SD, el ratón TS presenta un menor número de células proliferativas en la zona ventricular neocortical durante los estadíos embrionarios (Chakrabarti et al., 2007). También se han descrito alteraciones en la proliferación celular durante toda la vida del ratón TS en el DG (Rueda et al., 2005; Lorenzi y Reeves, 2006; Clark et al., 2006; Contestabile et al., 2007; Bianchi et al., 2010; Llorens-Martín et al., 2010) y en la zona subventricular (SVZ) (Bianchi et al., 2010a; 2010b; Trazzi et al., 2011). En el cerebelo, los ratones TS recién nacidos muestran un menor número de precursores de las células granulares en la capa granular externa (EGL) (Roper et al., 2006b; Contestabile et al., 2009a) y en la interna (IGL) (Contestabile et al., 2009b) que se debe, en parte, a la disminución de la respuesta de los precursores de las células granulares al factor mitogénico Sonic hedgehog (Shh) (Roper et al., 2006b).

Las alteraciones anteriormente descritas en la proliferación de los precursores neuronales parecen ser debidas a anomalías en el ciclo celular. Se ha observado que el ciclo celular de los precursores de las células granulares en la EGL e IGL es más lento,

siendo las fases G1 y G2 las más afectadas (Contestabile et al., 2009a). Igualmente, el ciclo celular en el ratón TS se alarga durante estadíos embrionarios en el área CA3 (Chakrabarti et al., 2007), así como en etapas tempranas post-natales en el DG (Contestabile et al., 2007). Además, los procesos de diferenciación neuronal también están afectados en los ratones TS. En su cerebelo, un menor porcentaje de células adquieren un fenotipo neuronal que en el de los ratones euploides (Contestabile et al., 2009a).

4.1.3. Alteraciones en la conectividad sináptica

Las alteraciones en la conectividad sináptica de los ratones TS incluyen anomalías morfológicas y funcionales de las sinapsis, dendritas y espinas dendríticas (Kasai et al., 2003; Newpher et al., 2009) que contribuyen al deterioro cognitivo que muestra este modelo.

En el ratón TS adulto, la longitud y arborización de las dendritas de las neuronas piramidales neocorticales están reducidas (Dierssen et al., 2003). Además, la densidad de espinas dendríticas es menor tanto en las neuronas piramidales neocorticales como en las células granulares del DG (Dierssen et al., 2003; Belichenko et al., 2004; Popov et al., 2011). Por otro lado, el ratón TS presenta anomalías en la morfología de las espinas, como el aumento del tamaño de la cabeza y la disminución en la longitud del cuello (Belichenko et al., 2004; 2007; Villar et al., 2005).

El ratón TS también muestra una reducción de la densidad sináptica en el neocórtex y en CA1 en etapas post-natales (Chakrabarti et al., 2007) y en el DG, CA1 y CA3 durante la edad adulta (Kurt et al., 2004). Sin embargo, el tamaño de los botones presinápticos y la longitud media de las hendiduras sinápticas se encuentran aumentados en la corteza e hipocampo de estos animales (Belichenko et al., 2004; 2007; 2009b).

Tabla 1. Características fenotípicas comunes entre personas con SD y el ratón TS

Alteraciones	SD	Ts65Dn
Volumen cerebral	Reducido	Reducido
Densidad neuronal	Reducida	Reducida
Volumen cerebelar	Reducido	Reducido
Densidad neuronal cerebelar	Reducida	Reducida
Neurogénesis	• Alteraciones en la proliferación de los precursores neurales. • Retraso del ciclo celular. • Alteraciones en la neurodiferenciación. • Alteraciones en la neurogénesis cerebelar.	• Alteraciones en la proliferación de los precursores neurales. • Retraso del ciclo celular. • Alteraciones en la neurodiferenciación. • Alteraciones en la neurogénesis cerebelar
Neurodegeneración	• Neuropatología de tipo EA. • Presencia de placas de β-amiloide y ovillos neurofibrilares. • Pérdida de neuronas colinérgicas. • Aumento del estrés oxidativo. • Microglía sobreactivada. • Aumento de citoquinas proinflamatorias.	• Aumento en los niveles de APP y péptidos β-amiloides. • Degeneración de las neuronas colinérgicas. • Aumento del estrés oxidativo. • Microglía sobreactivada.
Dendritas y espinas dendríticas	• Alteraciones en la morfología. • Densidad reducida.	• Alteraciones en la morfología. • Densidad reducida.

Tabla 1 (Continuación).

Densidad sináptica		• Reducida
Balance excitación/Inhibición	• Niveles reducidos de GABA en adultos con SD y EA. • Niveles reducidos de glutamato y aspartato en adultos.	• Aumento del número de sinapsis inhibidoras. • Disminución del número de sinapsis excitadoras. • Redistribución de las sinapsis inhibidoras. • Aumento del número de interneuronas GABAérgicas. • Alteraciones en la estructura del receptor $GABA_A$
Electrofisiología	• Alteraciones EEG. • Alteraciones en los potenciales evocados.	• Alteraciones en la LTP hipocampal.
Cognitivo-Conductuales	• Retraso en el desarrollo. • Hiperactividad ocasional. • Atención reducida. • Alteraciones del aprendizaje. • Alteraciones de memoria. • Adquisición tardía de habilidades motoras. • Habilidades lingüísticas alteradas.	• Retraso en el desarrollo. • Hiperactividad. • Atención reducida. • Alteración del aprendizaje. • Alteración de la memoria. • Adquisición tardía de habilidades motoras.
Otras	• Infertilidad en varones • Menor respuesta al dolor. • Alteraciones craneofaciales.	• Infertilidad en machos. • Menor respuesta al dolor. • Alteraciones craneofaciales.

4.1.4. Desequilibrio en el balance excitación-inhibición cerebral: el papel del GABA y el glutamato

Además de las alteraciones morfológicas y funcionales descritas en las espinas, las dendritas y las sinapsis, el ratón TS presenta anomalías en las características y en la distribución de los diferentes tipos de sinapsis. Esto provoca un desequilibrio entre las sinapsis GABAérgicas (inhibitorias) y glutamatérgicas (excitadoras) que da lugar a un exceso de inhibición en el cerebro. Este predominio de la actividad inhibidora cerebral parece ser uno de los mecanismos responsables de los déficits cognitivos del ratón TS.

El ratón TS tiene menos sinapsis excitadoras (asimétricas) en la corteza temporal, DG, CA1 y CA3 (Ayberk et al., 2000; Kurt et al., 2004). También se ha descrito un menor número de botones sinápticos inhibidores y un mayor número de botones excitadores (glutamatérgicos) en la capa molecular del hipocampo lo que altera en balance inhibición/excitación en esta estructura (Martínez-Cué et al., 2013; Corrales et al., 2014; García-Cerro et al., 2014). Además, los ratones TS presentan mayor número de neuronas GABAérgicas inhibitorias (Belichenko et al., 2004) en el DG, en la corteza somatosensorial (Perez-Cremades et al., 2010) y en el prosencéfalo basal (Chakrabarti et al., 2010). Asimismo, el ratón TS presenta alteraciones en la distribución de las sinapsis inhibitorias, con una relativa disminución de impulsos en las hendiduras sinápticas y un aumento en los cuellos de las espinas (Belichenko et al., 2004; 2007).

El cerebro del ratón TS también presenta alteraciones en la expresión y función de algunos de los receptores más relevantes de neurotransmisores inhibitorios y excitadores. En primer lugar, la expresión de las subunidades β2 y β3 del receptor $GABA_A$ en el hipocampo (Belichenko et al., 2009b) y de la subunidad α1 de este receptor está reducida en sinaptosomas de cerebro del ratón TS (Fernández et al., 2009). Además, se han descrito cambios en la subunidad R1 del receptor $GABA_B$ en este modelo de SD. Por otro lado, el aumento de la inhibición en la condición trisómica también se debe a alteraciones en la transmisión excitadora. Los receptores NMDA, junto con los AMPA, son esenciales para la codificación de la información. Los ratones TS presentan una reducción de la subunidad GluR1 del receptor AMPA (Belichenko et al., 2009) y de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA (Vink et al., 2009). Por último, se han

descrito alteraciones en los mecanismos de señalización mediados por el receptor NMDA implicados en los procesos de plasticidad sináptica (Siarey et al., 2006).

Alteraciones en otros sistemas de neurotransmisión

Además de las alteraciones descritas en los sistemas glutamatérgico y GABAérgico, el ratón TS presenta alteraciones en otros sistemas de neurotransmisión y cambios en la expresión y función de sus respectivos receptores.

Aunque los niveles de 5-HT en el hipocampo de los ratones TS son similares a los de ratones control (Megías et al., 1997), los niveles del receptor 5-HT_{1A} en ratones TS recién nacidos son menores (Bianchi et al., 2010a), alteración que podría contribuir a la deficitaria neurogénesis que muestran estos animales.

Por otro lado, los ratones TS presentan una pérdida de neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleous* a partir de los 6 meses de edad (Salehi et al., 2009). Además, aunque estos animales muestran unos niveles normales de adrenoceptores-β en la corteza y en el hipocampo, su función está alterada, con la consiguiente alteración en la producción basal de AMPc (Dierssen et al., 1997).

Asimismo, los niveles de acetilcolina en el cerebro disminuyen con la edad, como consecuencia de la reducción del número de neuronas colinérgicas (Granholm et al., 2000; Cooper et al., 2001; Hunter et al., 2003; 2004; Corrales et al., 2013). Esto afecta a los procesos implicados en la memoria y el aprendizaje, ya que, uno de los sustratos anatómicos más importantes del aprendizaje y la atención es el sistema colinérgico septohipocampal (Baxter et al., 1999; Bartus et al., 2000).

Por último, el ratón TS también presenta una reducción en los niveles de diversas neurotrofinas, como el BDNF (Bimonte-Nelson et al., 2003; Bianchi et al., 2010a; 2010b; Fukuda et al., 2010), la NT-3 (Pollonini et al., 2008) y el NGF (Cooper et al., 2001; Salehi et al., 2006).

4.1.5. Alteraciones en la plasticidad sináptica y en la LTP

En el ratón TS se han observado anomalías en la plasticidad sináptica a nivel hipocampal. Hanson et al. (2007) encontraron déficits en la eficacia sináptica, tanto en sinapsis excitadoras como inhibitorias, en neuronas piramidales del área CA3 del ratón TS. Además, en estos animales la LTP está disminuida y la LTD (*Long Term Depression*) incrementada en las regiones CA1 y DG del hipocampo (Siarey et al., 1997; 1999; Galdzicki et al., 2001; Kleschevnikov et al., 2004; Costa et al., 2005; Martínez-Cué et al., 2013). Estas alteraciones parecen ser debidas, en parte, al desequilibrio entre la neurotransmisión inhibitoria y excitadora descrito anteriormente (Belichenko et al., 2004; Kleschevnikov et al., 2004; Hanson et al., 2007; ver apartado 4.1.4). Además, la menor activación de los receptores NMDA durante la inducción de la LTP que presenta el ratón TS también contribuye a sus alteraciones en la magnitud de esta potenciación (Kleschevnikov et al., 2004).

4.1.6. Neurodegeneración

Al igual que ocurre en el SD, a lo largo de la vida del ratón TS, como consecuencia de la sobreexpresión de determinados genes, aparecen y progresan diversos procesos que aumentan la neurodegeneración y aceleran el deterioro cognitivo del ratón TS.

Aunque este modelo no desarrolla placas amiloides, ovillos neurofibrilares o las sinucleopatías características de individuos con SD que presentan neuropatología EA, los ratones TS también muestran niveles elevados de la proteína APP (Seo y Isacson, 2005; Rueda et al., 2010) y de los péptidos β-amiloides (Netzer et al., 2010) en la corteza y en el hipocampo. Además, los ratones TS también presentan hiperfosforilación de tau (Liu et al., 2008) y degeneración de neuronas colinérgicas y noradrenérgicas a partir de los 6 meses de edad (Cooper et al., 2001; Salehi et al., 2006; Millan Sanchez et al., 2012).

Al igual que en las personas con SD, el ratón TS presenta triplicado el gen *Sod1* cuya sobreexpresión tiene como consecuencia la sobreproducción de radicales libres altamente reactivos y tóxicos. En este modelo se han detectado niveles elevados de estrés oxidativo tanto en la corteza como en el hipocampo (Lockrow et al. 2009; Parisotto et al., 2016). Por último, el cerebro del ratón TS también muestra cambios

neuroinflamatorios como la activación de la microglía tanto en el hipocampo como en el prosencéfalo basal (Hunter et al., 2004; Lockrow et al., 2011), que juega un papel importante en la pérdida de neuronas colinérgicas (Kim y Suh, 2009).

4.1.7. Alteraciones cognitivas y conductuales

A nivel cognitivo-conductual, el ratón TS muestra un claro retraso en el desarrollo durante el periodo postnatal con alteraciones similares a las encontradas en personas con SD (Holtzman et al., 1996).

Los ratones adultos muestran conservadas algunas habilidades sensorimotoras como la fuerza de agarre, los reflejos posturales, el equilibrio y la capacidad de tracción (Escorihuela et al., 1995; Baxter et al., 2000). Sin embargo, en algunas situaciones, muestran deteriorado el equilibrio y la coordinación motora (Costa et al., 1999).

El ratón TS es hiperactivo durante la oscuridad (Escorihuela et al., 1995; Reeves et al., 1995; Holtzman et al., 1996) y en algunas situaciones experimentales que requieren cautela o una ausencia de movimiento como en la prueba de campo abierto y laberinto elevado en cruz (Escorihuela et al., 1995; Coussons-Read y Crnic, 1996; Martínez-Cué et al., 2005; Stewart et al., 2007). Esta hiperactividad se debe, en parte, a la falta de inhibición de ciertos comportamientos y a un déficit de atención (Escorihuela et al., 1998; Crnic y Pennington, 2000; Driscoll et al., 2004; Martínez-Cué et al. 2006).

Al igual que ocurre en el SD (Nadel, 2003), a nivel cognitivo los ratones TS tienen dificultades en la realización de tareas que dependen del hipocampo (Demas et al., 1996; Bianchi et al., 2010b; Martínez-Cué et al., 2013; García-Cerro et al., 2014), estructura implicada en la memoria espacial.

El ratón TS también presenta déficits en su memoria a corto plazo o de trabajo en las pruebas de alternancia espontánea en el laberinto en T o en Y (Belichenko et al., 2007; Fernandez et al., 2007; Pereira et al., 2009), en el laberinto acuático de Morris (MWM) (Escorihuela et al., 1998; Martínez-Cué et al., 2014) y en el laberinto radial (RAM) (Demas et al., 1996; Belichenko et al., 2007; Salehi et al., 2009; Bianchi et al., 2010b). Además, su memoria asociativa contextual está afectada en la prueba de

condicionamiento del miedo (*Contextual Fear Conditioning*, CFC) (Salehi et al., 2009; Yu et al., 2010b) y su memoria de reconocimiento en la prueba de reconocimiento de objetos (Fernandez et al., 2007). Todas ellas son tareas fuertemente dependientes del hipocampo (Morris et al., 1982; Morris et al., 1990), aunque para su correcta ejecución también es necesaria la adecuada función de otras estructuras como el cerebelo (Petrosini et al., 1998; Gandhi et al., 2000; Dickson et al., 2010).

Por último, el ratón TS también ha mostrado déficits de aprendizaje en pruebas de condicionamiento operante (Dowdy-Sanders y Wenger, 2006; Whitney y Wenger, 2013).

Al igual que ocurre en el SD, las alteraciones en memoria y aprendizaje del ratón TS se agravan según van envejeciendo (Hyde y Crnic., 2001; Hunter et al., 2003).

Objetivos

La presente tesis doctoral tiene como **principal objetivo** la evaluación de distintas estrategias terapéuticas para mejorar la cognición y algunas alteraciones neuromorfológicas encontradas en un modelo de SD.

Los **objetivos concretos** son los siguientes:

Estudio 1: Determinar si los efectos beneficiosos de la **reducción de la inhibición mediada por el receptor $GABA_A\alpha5$ tras la administración crónica del NAM RO4938581** se mantienen a largo plazo después de interrumpir el tratamiento en los siguientes fenotipos alterados del ratón TS:

1. **Aprendizaje y memoria** espacial y asociativa
2. Capacidad de **atención**, **actividad general** y **ansiedad**
3. El patrón conductual incluyendo los **reflejos sensoriales**, la **actividad espontánea** y la **coordinación motora**
4. Mecanismos subyacentes a los **fenotipos cognitivo-conductuales** mediante:
    a. El análisis del estado de la **neurogénesis hipocampal adulta** evaluando la densidad de células proliferativas, neuroblastos en diferenciación y de la densidad de células granulares
    b. El análisis del **balance inhibidor-excitador** en la capa molecular del hipocampo

Estudio 2: Evaluar el efecto de la **administración prenatal del ácido linolénico, ácido oleico y curcumina** en el ratón Ts65Dn sobre:

1. **Natalidad**, **viabilidad**, **peso corporal y cerebral** de las crías
2. Las alteraciones en la neuroanatomía y neurogénesis **hipocampal**

Material y métodos

1. Animales de experimentación

1.1. Mantenimiento y manipulación de los animales

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

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

1.2. Obtención del modelo animal

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

En ambos estudios se cruzaron hembras Ts65Dn (TS) con machos híbridos C57BL/6Ei-C3H/HeSNJ (B6EiCSn) F1, suministrados por *The Robertsonian Chromosome Resource* (*The Jackson Laboratory*, Bar Harbor; ME USA), para obtener los ratones TS utilizados en ambos estudios que presentaban trisomía segmentaria del MMU16.

En todos los experimentos, los animales se compararon con otros de su misma camada con una dotación cromosómica normal (CO).

1.3. Cariotipado de los animales

Aproximadamente un tercio de los animales nacidos en cada camada es trisómico. Por tanto, con el fin de distinguir su cariotipo, los animales se cariotiparon mediante PCR cuantitativa siguiendo el protocolo descrito por Liu et al. (2003).

1.3.1. Obtención y preparación de las muestras

El ADN genómico necesario para el cariotipado de los animales se consiguió mediante la digestión de fragmentos de cola de ratón. Así, en el momento del destete de los animales, se tomaron muestras de aproximadamente 2 mm y se colocaron en un tubo de 1.5 ml tipo Eppendorf. Se añadieron 300 µl de NaOH 50mM y se incubaron durante 30 minutos en un bloque seco Tembloc (JP Selecta, Barcelona, España) a 98 °C. Las muestras se agitaron y se volvieron a incubar durante 30 minutos a 98 °C. Se repitió este último paso hasta conseguir una digestión completa. Una vez terminada la digestión se añadieron 30 µl de Tris 1M (pH=8) para neutralizar la reacción. A continuación, se centrifugaron durante 10 minutos a 13000 r.p.m. (revoluciones por minuto) en una centrifuga Biofuge fresco (Heraeus Instruments, Hanau, Alemania) y se recogió el sobrenadante. Finalmente se cuantificó el ADN en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermoscientific, Waltham, MA, USA) (A260) y se diluyó en H_2OmiliQ (H_2OmQ) hasta una concentración de 20 ng/µl para llevar a cabo la PCR cuantitativa en tiempo real (*quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR).

1.3.2. PCR cuantitativa en tiempo real

Para poder diferenciar los ratones CO y TS los animales fueron cariotipados mediante qPCR utilizando el protocolo descrito por Liu et al. (2003). Como marcadores fueron empleados los genes codificantes para la proteína precursora del β-amiloide (*App*) y de resistencia a Mixovirus 1 (*Mx1*). Ambos se encuentran situados cerca de los extremos proximal y distal, respectivamente, del segmento del cromosoma murino MMU16 triplicado en el ratón TS. Como control interno para normalizar las variaciones en la cantidad de ADN se utilizó el gen de la apolipoproteína B (*ApoB*) que está situado en el cromosoma MMU12 y, por consiguiente, siempre está presente en doble dosis en todos los animales del estudio. La amplificación del ADN genómico de cada animal se llevó a cabo utilizando cebadores sentido y antisentido específicos para cada gen y sondas de tipo TaqMan (**tabla 2**). La técnica permite cuantificar simultáneamente los 3 genes de interés utilizando sondas que presentan fluorocromos con distintas longitudes de onda: VIC para el gen *ApoB y* FAM *para App y Mx1.* Así es posible determinar si en cada muestra se encuentran dos o tres copias de los genes *App* y *Mx1*, comparándolos con el

gen control *ApoB,* y distinguir entre animales CO y TS respectivamente. Para comparar cada par de genes se utilizó: 8 µl de ADN genómico diluido a 20 ng/µl (160ng/pocillo), 10 µl de 2x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA), 0.2 µl de cada cebador del gen problema a una concentración de 40 µM (Metabion, Martinsried, Alemania), 0.2 µl 40 µM de cada cebador del gen control y 0.6 µl de cada sonda a una concentración de 5 µM (Applied Biosystems).

Tabla 2. Cebadores y sondas TaqMan utilizadas para la qPCR.

	App	***Mx1***	***ApoB***
Cebador sentido	5´-TGC TGA AGA TGT GGG TTC GA-3´	5´-TCT CCG ATT AAC CAG GCT AGC TAT-3´	5´-CAC GTG GGC TCC AGC ATT-3´
Cebador antisentido	5´-GAC AAT CAC GGT TGC TAT GAC AA-3´	5´-GAC ATA AGG TTA GCA GCT AAA GGA TCA-3´	5´-TCA CCA GTC ATT TCT GCC TTT G-3´
Sonda	5´-6FAM- CAA AGG CGC CAT CAT CGG ACT CA-TAMRA-3´	5´-6FAM- CTT TCC TGG TCG CTG TGC A-TAMRA-3´	5´-VIC-CCA ATG GTC GGG CAC TGC TCA A-TAMRA-3´

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

Los resultados obtenidos con el programa MxPro-3005P se analizaron mediante el método Livak (Livak y Schmittgen, 2001), donde la cuantificación relativa de la expresión génica se realizó utilizando la fórmula:

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

Donde Ct (*Cycle Threshold*) es el ciclo de la qPCR en el cual se detecta un incremento significativo de la fluorescencia. Los resultados se presentan como cantidades en

número de veces con respecto al control (calibre), valor de 1 para los animales CO y valor de 1.5 para los TS.

La valoración de cada uno de los genes problema se determinó en dos experimentos independientes en los que cada muestra se evaluó por duplicado dentro de una misma placa.

1.4. Grupos experimentales y tratamientos farmacológicos

1.4.1. Estudio 1: Efecto de la administración a largo plazo de un modulador alostérico negativo para la subunidad α5 del receptor $GABA_A$ sobre los déficits cognitivos y neuromorfológicos del ratón TS

Con el fin de evaluar los efectos a largo plazo de la administración del NAM RO4938581 (F. Hoffmann-La Roche, Basilea, Suiza) sobre diversas alteraciones cognitivo-conductuales y neuromorfológicas, se utilizó una cohorte de ratones macho (**figura 7**).

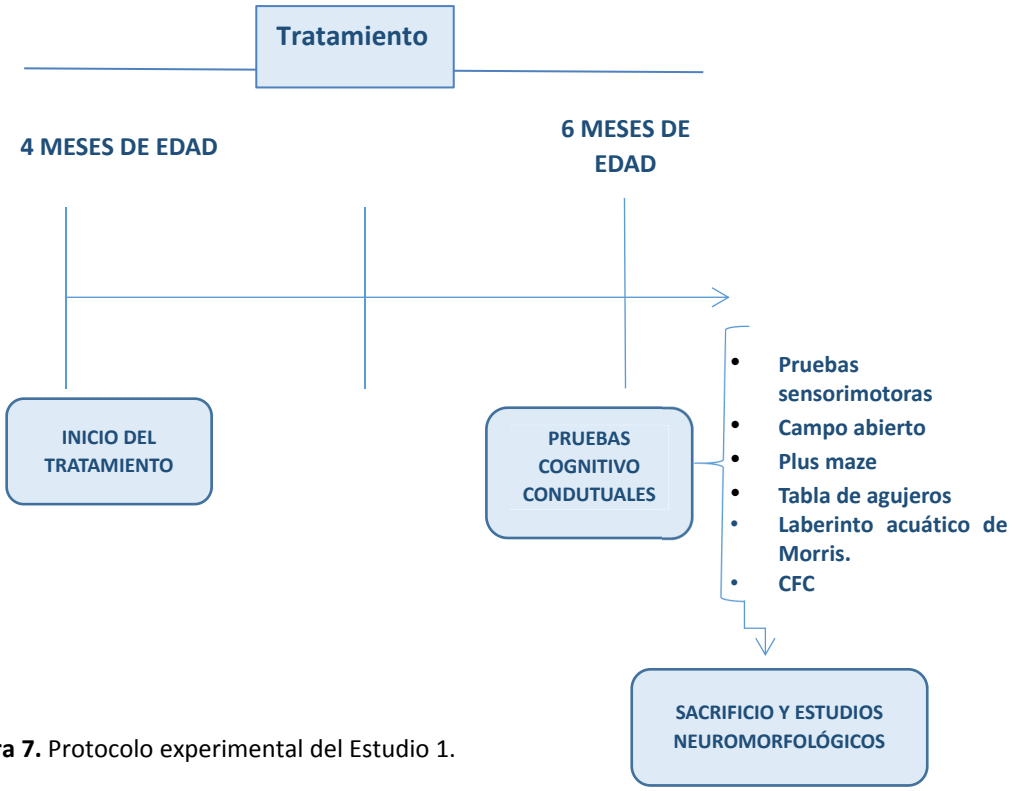

Figura 7. Protocolo experimental del Estudio 1.

Los animales utilizados en este estudio tenían entre 4 y 4.5 meses al inicio del tratamiento y entre 6 y 6.5 meses al finalizar los experimentos cognitivo-conductuales. En este Estudio se utilizó un total de 89 animales de ambos genotipos que se asignaron de forma aleatoria a una de las seis condiciones experimentales que se describen a continuación (**tabla 3**).

Tabla 3. Número de animales asignados a cada grupo experimental en el Estudio 1

	Grupo experimental					
	CO			**TS**		
	RO4938581	**RO4938581-VEH**	**VEH**	**RO4938581**	**RO4938581-VEH**	**VEH**
Conducta	19	16	13	16	14	11
Inmunohistoquímica	8	8	8	8	8	8

En la primera condición experimental (RO4938581), los animales CO y TS recibieron RO4938581 durante un total de 12 semanas, 8 correspondientes al período de tratamiento y 4 correspondientes al período de pruebas conductuales.

Para evaluar los efectos del fármaco tras la interrupción del tratamiento, en la segunda condición (RO4938581-VEH), los animales recibieron RO4938581 durante 4 semanas y en las 8 semanas restantes (4 de tratamiento y 4 correspondientes al período de pruebas conductuales), los animales recibieron vehículo.

Los animales TS y CO asignados a la tercera condición (VEH) recibieron vehículo durante un total de 12 semanas, 8 correspondientes al período de tratamiento y 4 correspondientes al período de pruebas conductuales.

El fármaco RO4938581 se administró por vía oral voluntaria a una concentración de 20 mg/Kg disuelto en batido de chocolate (Puleva, Granada, España). Como vehículo se utilizó el mismo batido de chocolate en el que se disolvió el fármaco. Tanto el fármaco como el vehículo se administraron de forma individual una hora antes de realizar las pruebas conductuales.

Los ratones se separaron en jaulas limpias en cuyo interior había una placa de Petri con el tratamiento correspondiente. Con el fin de entrenar a los animales para que durante

el periodo de tratamiento bebieran el fármaco o el vehículo en menos de 5 minutos, durante una semana antes de empezar dichos tratamientos, se administró diariamente a los animales de todos los grupos un volumen de 150 µl de batido de chocolate siempre a la misma hora.

La dosis de 20 mg/Kg de RO4938581 se eligió porque daba lugar a una concentración plasmática que se correlacionaba con una ocupación de los receptores $GABA_A\alpha5$ del 50-70 % en el hipocampo (Martínez-Cué et al., 2013). Además, estudios previos han demostrado que RO49388581 se une a los receptores $GABA_A\alpha5$ de forma dosis-dependiente y que una ocupación del 30 % de los receptores es suficiente para mejorar la cognición en ratas (Ballard et al., 2009).

Para comprobar que se estaban alcanzando las concentraciones plasmáticas correctas se obtuvieron muestras de sangre de ratones CO y TS tratados de todos los grupos experimentales en las semanas 1, 3 y 5 desde el inicio del tratamiento. Dichas muestras fueron enviadas a F. Hoffmann-La Roche Ltd. para su análisis.

1.4.2. Estudio 2: Efecto de la administración prenatal de ácido linolénico, ácido oleico y curcumina sobre la neurogénesis hipocampal del ratón TS

Con el fin de evaluar el efecto de la administración de ácido linolénico, ácido oleico y curcumina durante el periodo prenatal sobre la neurogénesis hipocampal, se utilizaron un total de 52 animales procedentes de hembras gestantes a las que se les administró uno de los 3 compuestos o el vehículo (*Bobine Serum Albumin*, BSA) (**tabla 4**). Los estudios neuromorfológicos se realizaron en las crías sacrificadas el día postnatal 2 (P2).

Para comprobar que las hembras TS tratadas estaban preñadas se observaron los tapones vaginales en las madres dos veces al día a la misma hora (9:30 A.M. y 18:30 P.M.). Si se confirmaba la presencia del tapón se procedía a la separación de la hembra.

Diez días después, en el estadio E10 de la gestación, se comenzó a administrar los distintos tratamientos. Se trató diariamente a las hembras preñadas con una inyección subcutánea (s.c.) del compuesto correspondiente o del vehículo hasta el momento del parto (**figura 8**). Se utilizó esta vía de administración porque suponía un menor riesgo para la gestación y porque la curcumina presenta una limitada absorción

gastrointestinal. Para unificar las condiciones de los tratamientos se decidió aplicar este criterio en todos los compuestos.

Tras el nacimiento se administró por vía s.c. a las crías durante los días postnatales 1 (P1) y 2 (P2) vehículo o el mismo compuesto que habían recibido las madres durante la gestación (**figura 8**). Durante estos dos días las madres siguieron recibiendo el tratamiento ya que se encontraban en el período de lactancia y podían trasmitir los compuestos a sus crías a través de la leche.

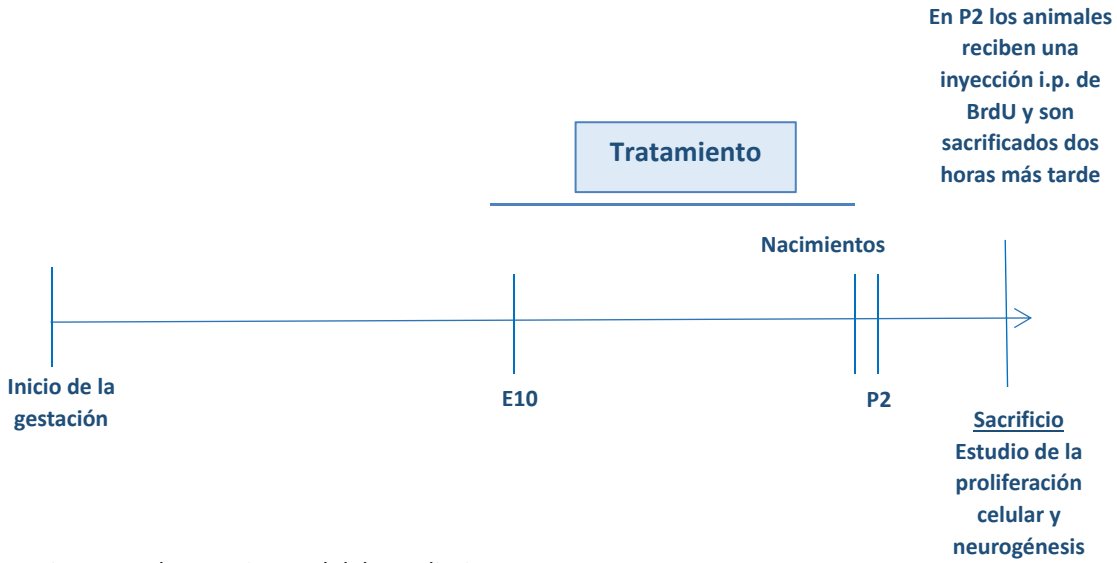

Figura 8. Protocolo experimental del Estudio 2.

Las dosis elegidas para la suministración de las sustancias fueron las siguientes: 500 mg/kg para el ácido linolénico, 400 mg/kg para el ácido oleico (Trépanier et al., 2012) y 300 mg/kg (Nam et al., 2014) para la curcumina. Los fármacos se disolvieron en el vehículo: una solución de BSA al 10 % en suero fisiológico (NaCl 0,9 %, Braun). Los animales TS y CO del grupo vehículo recibieron esta solución de BSA a una concentración de 300 mg/kg.

Se eligieron estas dosis porque se ha demostrado que las concentraciones de los distintos compuestos eran suficientes para promover un efecto neurogénico positivo (Trépanier et al., 2012; Nam et al., 2014; Cutuli et al., 2014; 2016).

El BSA se seleccionó como vehículo debido a su función como transportador en la sangre y a través de las membranas plasmáticas. Además, debido a la naturaleza hidrofóbica de

las sustancias suministradas era necesario que éstas fueran combinadas con otra molécula capaz de disolverlas. El BSA gracias a su estructura química se une a las moléculas hidrofóbicas y las solubiliza en suero salino facilitando su administración, transporte y posterior absorción.

Una hora después de haber finalizado el tratamiento y dos horas antes de ser sacrificados por decapitación, los animales recibían una inyección intraperitoneal (i.p.) de BrdU a una dosis de 150 μg/gr.

Para comprobar los niveles plasmáticos de los tres compuestos en la sangre de las crías, ácido linolénico, ácido oleico y curcumina, se enviaron muestras de sangre al servicio de análisis elemental, cromatografía y masas de la universidad de Salamanca donde se analizaron mediante HPLC (*high performance liquid chromatography*).

Tabla 4. Número de animales asignados a cada grupo experimental en el Estudio 2

Ácido linolénico		Ácido Oleico		Curcumina		BSA	
CO	TS	CO	TS	CO	TS	CO	TS
6	6	7	7	7	6	7	6

2. Caracterización cognitivo-conductual

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

2.1. Reflejos sensoriales y función motora

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

a) Respuesta de alcance

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

b) Respuesta de sobresalto

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

c) Reflejo de enderezamiento

Para evaluar posibles alteraciones vestibulares se colocó al animal sobre una superficie situada a 10 cm de altura. Cogiendo al animal por la cola, se realizó un giro de 180 ° dejándolo caer sobre una superficie blanda. Se evaluó la capacidad del ratón de enderezarse en el aire y caer sobre las cuatro patas. Se otorgó una puntuación de (3) si caía sobre las cuatro patas, (2) si caía sobre un lado, (1) si caía de espaldas y (0) si no se daba la vuelta al ser colocado de espaldas sobre una superficie plana (reflejo de enderezamiento en superficie).

d) Fuerza de agarre

Para esta prueba se utilizó una rejilla de barras de acero inoxidable situada de manera que presentara una inclinación de 45 °. Se colocó al ratón sobre ella y se tiró suavemente de la cola valorando la fuerza con que el ratón se sujetaba con las patas delanteras ejerciendo resistencia a ser separado de ella. Se puntuó (4) si el agarre era muy eficaz,

(3) si se sujetaba activamente, (2) si lo hacía de forma moderada, (1) si se agarraba levemente y (0) si no se agarraba.

e) Equilibrio

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

f) Reflejo prensil y capacidad de tracción

Ambos parámetros se valoraron en el mismo ensayo. Se colocó al ratón colgado por las patas delanteras en el centro de una percha metálica de 2 mm de diámetro y 40 cm de longitud, a una altura de 32 cm del suelo (figura 8). Se realizaron 3 ensayos de 5 segundos de duración cada uno con un período interensayo de 1 minuto. La puntuación del reflejo prensil fue de (0) si el ratón se caía y de (1) si permanecía colgado durante los 5 segundos que duraba en ensayo. La puntuación máxima fue de (3). En la prueba de capacidad de tracción se otorgaba una puntuación de (0) si el animal no subía ninguna de las patas traseras a la barra, (1) si subía una pata, (2) si subía las dos patas y (3) si era capaz de alcanzar el extremo de la percha. La puntuación máxima fue de (9).

g) Coordinación motora: prueba de la percha

Se utilizó la misma percha que en la prueba anterior pero, en este caso, la barra horizontal se dividió en 8 zonas de 5 cm cada una (**figura 8**). Se situó al ratón en el centro

de la barra colgado por las patas delanteras. Se hizo un único ensayo de 60 segundos en el que se midieron: la latencia de caída, el número de desplazamientos (se consideró desplazamiento cuando el ratón cruzaba una de las zonas marcadas) y la latencia de llegada a uno de los extremos.

Figura 8. Prueba de equilibrio sobre barra de madera (A) y de aluminio (B). Prueba de la percha (C).

h) Coordinación motora: rotarod

Esta prueba se utilizó para evaluar la coordinación motora de los animales siguiendo el protocolo descrito por Martínez-Cué et al. (2013). Para ello se utilizó un Rotarod (UGO BASILE, Comerio, VA, Italia). El aparato consta de un rodillo de plástico, con una superficie estriada para facilitar el agarre, de 37 cm de longitud que gira a distintas velocidades y está dividido por 6 discos de plástico de 12 cm de diámetro que separan el rodillo en 5 compartimentos, en cada uno de los cuales se puede introducir un ratón y medir la ejecución de 5 animales a la vez (**figura 9**). Este aparato tiene incorporados cinco contadores individuales de tiempo que se detienen cuando el animal cae del rodillo.

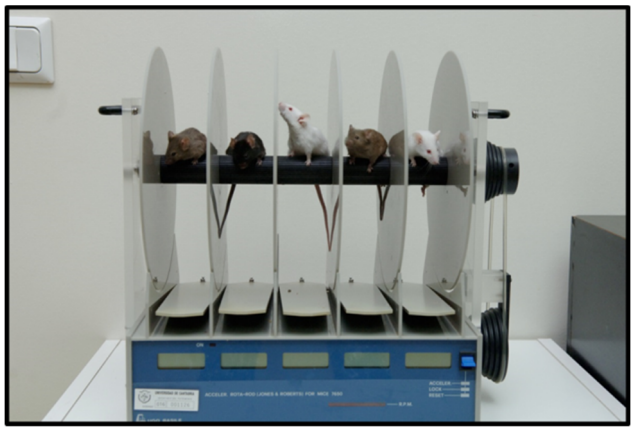

Figura 9. Prueba de coordinación motora en el rotarod.

Se realizaron 4 ensayos en una única sesión. El primer ensayo consistió en un entrenamiento en el que el animal debía mantenerse sobre el rodillo durante 60 segundos a una velocidad de 5 r.p.m., si el animal caía antes de completar este tiempo se volvía a colocar en el aparato hasta que se mantenía sobre el rodillo durante los 60 segundos. A continuación, se realizaron otros dos ensayos a velocidades de 25 y 50 r.p.m. respectivamente. El tiempo máximo de permanencia fue de 60 segundos. El último ensayo consistió en un ciclo de aceleración en el que el rodillo iba girando progresivamente a más velocidad (hasta llegar a un máximo de 50 r.p.m.). El tiempo máximo de permanencia permitido era de 300 segundos (coincidiendo con el momento en el que se alcanzaba la velocidad máxima).

2.2. Ansiedad: campo abierto y laberinto en cruz

a) Campo abierto

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

El campo abierto consistía en una superficie cuadrada de 55 cm de lado rodeada por paredes de 25 cm de altura, fabricado en madera de color blanco (**figura 10**).

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 entradas a ambas zonas) y actividad vertical (incorporaciones o número de veces que el ratón se endereza sobre sus patas traseras). El aparato se iluminó con dos fuentes de luz para someter al animal a una situación estresante. Todos los ensayos fueron grabados en video y posteriormente analizados con el programa de análisis de imagen Anymaze (ANY-maze®, Stoelting Colorado, USA).

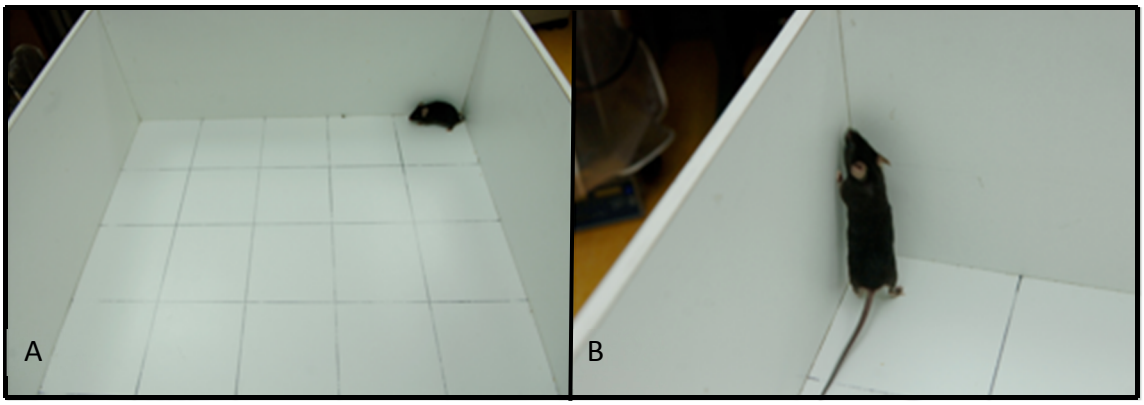

Figura 10. Prueba del campo abierto. En la imagen se observa al animal realizando actividad horizontal en la periferia (A) y actividad vertical (B).

b) Laberinto elevado en cruz

Para valorar distintos parámetros relacionados con la ansiedad se utilizó la prueba del laberinto elevado en cruz siguiendo el protocolo descrito por Martínez-Cué et al. (2005). Este aparato está formado por dos brazos abiertos (5 cm de ancho x 30 cm de largo) y dos cerrados con láminas de metacrilato (5 cm de ancho x 30 cm de largo) elevados a 40 cm sobre el suelo (**figura 11**).

La prueba consistió en un único ensayo de 5 minutos en el que se colocó al ratón en el centro del aparato y se contabilizaron el número de entradas y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos y cerrados. Como criterio se consideró que la entrada a cada brazo se debía producir con las 4 patas.

Por otro lado, se analizaron los componentes cognitivos de la ansiedad, es decir, las conductas de evaluación de riesgo que realizaron los animales, como son el número de alzamientos (*rearings*), las conductas de aproximación-retirada desde las zonas protegidas del laberinto (*stretchings*) y el número de veces que asomaban la cabeza por los brazos abiertos (*head-dippings*).

Todos los ensayos fueron grabados en video y posteriormente se analizó la distancia recorrida en brazos abiertos y cerrados y la velocidad de cada animal con el programa de análisis de imagen Anymaze.

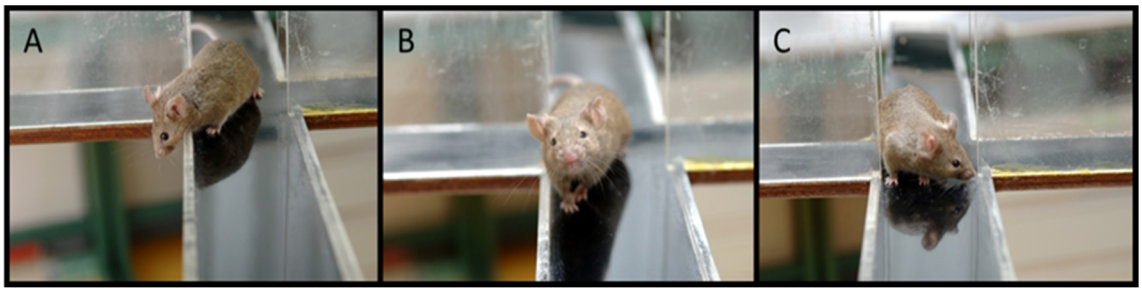

Figura 11. Prueba del laberinto elevado en cruz. En la imagen se observa al animal realizando un *head-dipping* (A), entrando en un brazo abierto (B) y realizando una conducta de aproximación-retirada (C).

2.3. Atención y actividad exploratoria: tabla de agujeros

Se evaluó la actividad exploratoria en la tabla de agujeros siguiendo el protocolo 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 12**). Dos de los agujeros contenían objetos (una llave, un trozo de cuerda, una arandela de plástico) y dos estaban vacíos.

En un único ensayo de 5 minutos se midieron: el número de exploraciones, es decir, las veces que el animal metía la cabeza en los agujeros (número de *head-dippings*), el tiempo que exploraba cada agujero y la actividad general en el aparato: la distancia recorrida y el número de incorporaciones. Para evaluar la atención de los animales se calculó el número de repeticiones de exploraciones de agujeros previamente explorados (índice ABA).

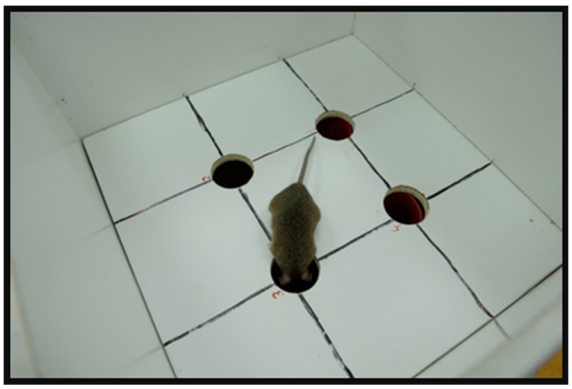

Figura 12. Prueba de la tabla de agujeros. En la imagen se observa un animal realizando una exploración o *head-dipping*.

2.4. Aprendizaje y memoria: laberinto acuático de Morris y test de condicionamiento del miedo

a) Laberinto acuático de Morris

La valoración del aprendizaje y la memoria espacial se realizó utilizando una versión modificada del laberinto acuático de Morris (Morris et al., 1982).

La prueba se llevó a cabo en un tanque metálico circular de 120 cm de diámetro que contenía agua teñida con dos litros de leche hasta una altura de 25 cm y a una temperatura constante de 22-24 °C. En el interior del tanque se colocó una plataforma de metacrilato transparente de 9 cm de lado situada a 22 cm de la pared del tanque (**figura 13**). El agua se cambió cada dos sesiones.

El experimento consistió en 16 sesiones: 8 de adquisición con la plataforma sumergida en una posición distinta cada día, 4 sesiones extra de adquisición con la plataforma sumergida siempre en la misma posición, seguido de un ensayo de retirada de la plataforma (**figura 13**) y 4 sesiones de aprendizaje guiado, con la plataforma visible en una posición distinta cada día (**figura 14**). A continuación se detalla el protocolo experimental.

Sesiones de adquisición

En las sesiones de adquisición (sesiones 1 a 8) la plataforma permaneció sumergida 2 cm por debajo del nivel del agua (**figura 13A**). Durante estas sesiones, la posición de la plataforma varió cada día entre cuatro posibles, este, suroeste, centro y noroeste (E, SO, centro, NO) (**figura 14**). En cada sesión de adquisición los animales realizaron 4 pares de ensayos con un total de 8 ensayos en cada una de estas posiciones. Al comienzo de cada ensayo se introducía al ratón en el agua con la cabeza mirando hacia la pared del tanque y se le permitía nadar hasta localizar la plataforma durante un período máximo de 60 segundos. Si el ratón encontraba la plataforma se le dejaba permanecer sobre ella durante 20 segundos y en caso de no localizarla se sacaba al ratón del agua y se le situaba encima de ella durante el mismo período de tiempo. En cada par de ensayos el animal era introducido en el tanque de agua por una de las cuatro posiciones posibles (N, S, E,

O) que se establecían al azar. Inmediatamente después del primer ensayo de cada par se volvía a introducir al animal en el tanque por la misma posición de entrada (segundo ensayo de cada par). Al finalizar el segundo ensayo de cada par el ratón se situaba en una jaula con serrín y cerca de una estufa durante 30 minutos. En cada sesión, cada par de ensayos se realizó con un intervalo de 30-45 minutos entre ellos. Fuera del laberinto había varias señales visuales fijas, constantemente visibles desde el aparato.

Este protocolo permite evaluar distintos aspectos del aprendizaje espacial tales como la memoria a largo plazo, también llamada memoria de referencia, examinando la latencia de escape del animal a lo largo de las sesiones, el aprendizaje procedimental y la memoria espacial, estudiando los patrones de búsqueda de la plataforma, así como la memoria a corto plazo o memoria de trabajo.

Durante las primeras 8 sesiones, cada día el animal debe aprender una nueva localización de la plataforma. Por lo tanto, el análisis de la ejecución de los ratones a lo largo de las sesiones (la media de todos los ensayos de cada sesión) proporciona una medida de la **memoria de referencia**. Según van progresando las sesiones el animal debe construir una representación estable del entorno, es decir, un mapa de coordenadas que puede ser considerado como el componente de memoria de referencia de la tarea, diferente de la representación de la posición más reciente en la que la plataforma estaba situada. También se valoró la **memoria de trabajo**, para ello se analizó la ejecución de los ratones a lo largo de todos los ensayos de una misma sesión. Durante las sesiones en las que la plataforma cambia de posición cada día el animal busca la plataforma y, en cada sesión, a lo largo de los ensayos aprende su localización, fija esta información, codificándola y recordándola.

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

Sesiones extra de adquisición

Se realizaron 4 sesiones adicionales (sesiones 9 a 12), en las que se procedió del mismo modo que en las primeras 8 sesiones de adquisición para el análisis del **aprendizaje espacial**. La diferencia residía en que la ubicación de la plataforma sumergida fue constante (SO). Tras la última sesión de adquisición se realizó un único ensayo de 60 s en el que la plataforma era retirada (**figura 14**) para evaluar si los ratones recordaban la posición de la plataforma (**memoria espacial**). Para ello se analizaron el número de cruces sobre la posición donde se encontraba la plataforma en las últimas 4 sesiones y el porcentaje de tiempo que permanecían en cada cuadrante.

Sesiones de aprendizaje guiado

Para descartar la influencia de factores motivacionales o sensorimotores que interfieran en la búsqueda de la plataforma se realizaron 4 sesiones de aprendizaje guiado (sesiones 13 a 16). En este caso la plataforma era visible ya que el nivel de agua del tanque se situó 2 cm por debajo de la plataforma (**figuras 13B** y **14**). Además, su posición se indicó mediante una bandera de 9 x 5 cm de colores llamativos, situada sobre un mástil de 10 cm de altura colocado en una de las esquinas de la plataforma. El procedimiento experimental en estas sesiones fue idéntico al empleado en las de adquisición.

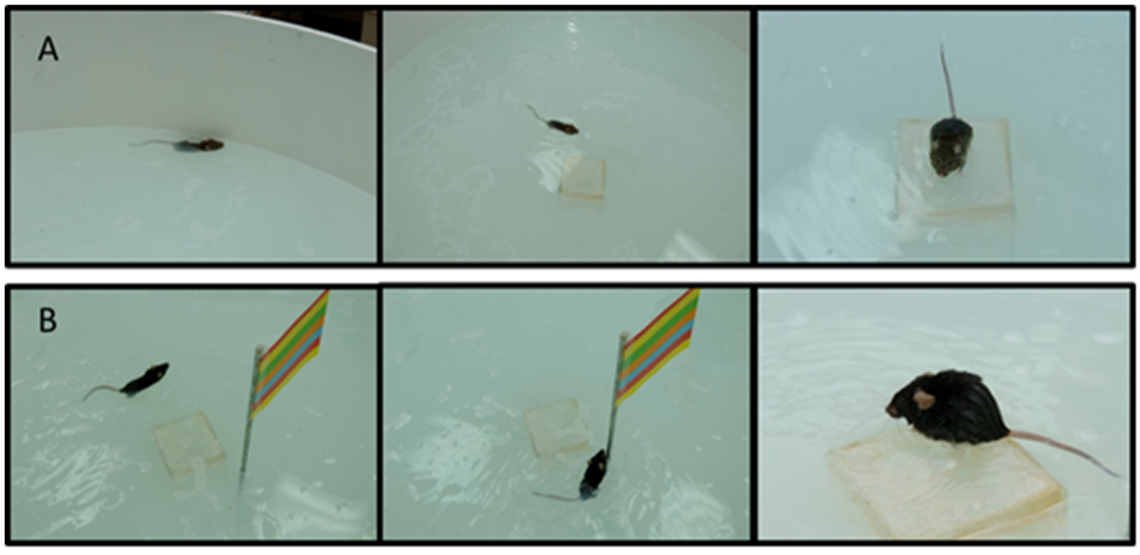

Figura 13. Prueba del laberinto acuático de Morris. Secuencia de una sesión de adquisición en la que el animal nada hasta encontrar la plataforma localizada 2 cm por debajo del nivel del agua (A). Secuencia en una sesión de aprendizaje guiado en la que la plataforma se encuentra por encima del nivel del agua y está señalada con una bandera (B).

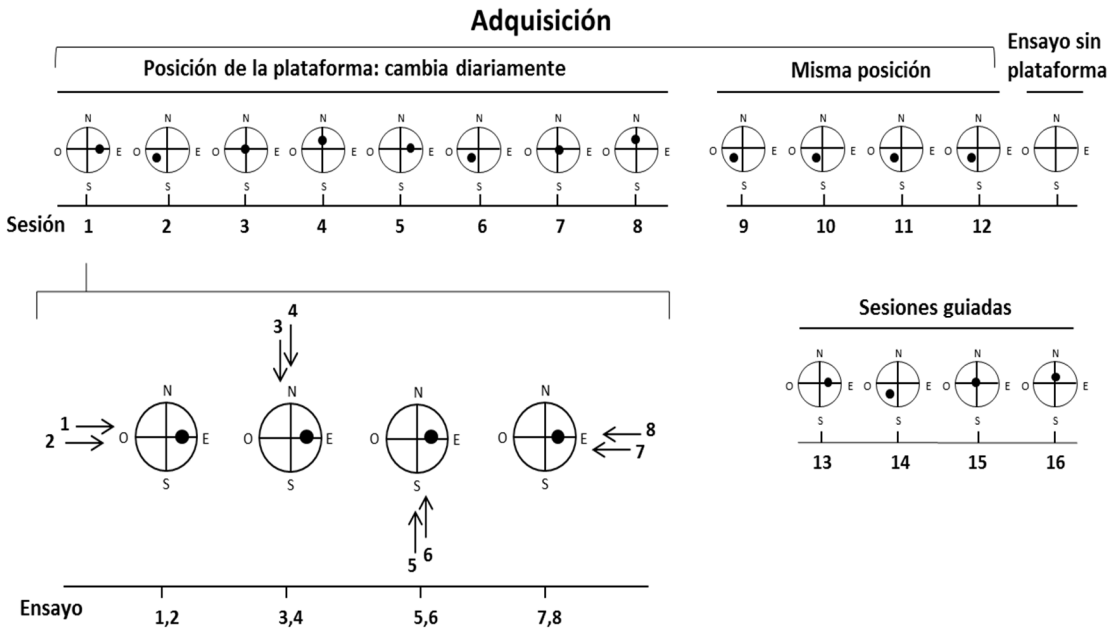

Figura 14. Esquema del protocolo utilizado en laberinto acuático de Morris.

b) Test de condicionamiento del miedo a un contexto

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

Para realizar esta prueba se siguió el protocolo descrito por Salehi et al. (2009) y se utilizó el sistema de condicionamiento del miedo *Fear Conditioning Apparatus* (Stoelting) y el programa de seguimiento de vídeo Anymaze. El aparato consistió en una urna de metacrilato de 18 x 18 x 30 cm y un suelo de rejilla metálica, a través del cual se pueden administrar descargas eléctricas, colocado dentro de una cámara insonorizada de 44 x 54 x 54 cm con una fuente de sonido en su interior (**figura 15**).

La prueba constó de tres sesiones realizadas en días sucesivos: una de condicionamiento, una de evaluación de la asociación tono-descarga y, por último, una de valoración de la asociación contexto-descarga. En la primera sesión, se colocó a los animales en el aparato, en el que se habían colocado paredes con rayas blancas y negras verticales (estímulo contextual) y se les dejó explorar libremente durante 3 minutos. A continuación, se realizaron 5 ensayos de condicionamiento tono-contexto-descarga. En cada uno de estos ensayos de 80 segundos de duración, siempre en el mismo contexto con paredes con rayas blancas y negras, se emitió un sonido durante los primeros 20 segundos (70 dB, 2 KHz) y 18 segundos después se administró una descarga eléctrica (0.5 mA, 50 Hz, 2 segundos), el ensayo continuaba hasta completar los 80 segundos. En la segunda sesión (test de asociación tono-descarga) los animales fueron colocados en el mismo aparato pero se cambió el contexto en el que se había producido el entrenamiento la sesión anterior, las paredes rayadas se sustituyeron por paredes de color gris neutro. Se realizaron 3 ensayos de 80 segundos cada uno sin estímulo aversivo, en los que se emitió un tono de las mismas características que el día anterior. En la última sesión (test de asociación contexto-descarga), se colocó a los animales durante 5 minutos en el mismo contexto de la sesión de entrenamiento (paredes con rayas verticales) y no se emitió ningún tono o descarga.

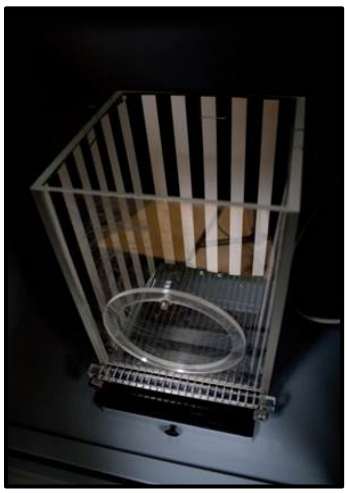

Figura 15. Aparato de condicionamiento del miedo.

3. Caracterización neuromorfológica

En los dos Estudios realizados en esta tesis doctoral se evaluaron los efectos de los distintos tratamientos sobre diferentes aspectos celulares y morfológicos usando técnicas de inmunohistoquímica.

3.1. Perfusión y preparación de los tejidos

3.1.1. Estudio 1

En este Estudio los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (pentobarbital sódico 20 mg/ml, etanol 10 %, propilenglicol 20 %), sacrificados y perfundidos por vía intracardiaca primero con salino (0.9 %) y luego con paraformaldehído al 4 %, pH 7.0, en PBS 1x (PBS 10x: NaCl 80 g/l, KCl 2 g/l, Na_2HPO_4 6.1 g/l). Para este procedimiento se utilizó una bomba peristáltica ISMATEC ISM 829 (IDEX Health & Science, Wertheim, Alemania) a un flujo constante de 5 ml/minuto. Después de la perfusión, todos los cerebros fueron post-fijados con paraformaldehído a 4 °C durante 24 horas y posteriormente transferidos a una solución de sacarosa al 30 % en PBS 1x para su deshidratación. Una vez deshidratados, se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80 °C.

Para realizar la inmunohistoquímica en flotación y las tinciones se obtuvieron secciones seriadas coronales de 50 µm de grosor en criostato de todo el hipocampo. Los cortes se fueron depositando en pocillos de placas de cultivo, rellenados previamente con solución crioprotectora (etilenglicol 25 %, glicerol 25 %, PBS 1X 50 %), en 9 series. Finalmente se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

3.1.2. Estudio 2

En este estudio los animales fueron sacrificados por decapitación en P2. Se registraron los valores del peso del cerebro con el cerebelo (datos no mostrados) y del cerebro solo. Tras la retirada del cerebelo, los hemisferios se dividieron por la línea media.

El hemisferio derecho se fijó por inmersión en una solución de parafolmaldehído al 4 % durante 48 horas. Posteriormente se transfirió a una solución de sacarosa al 30 % en

PBS 1x para su deshidratación. Una vez deshidratado se congeló en hielo seco y se almacenó a -80 °C. El hemisferio izquierdo se congeló y conservó a -80 °C.

Para realizar la inmunohistoquímica y las tinciones correspondientes se realizaron secciones coronales de 8 µm de grosor en criostato de todo el hipocampo. Los cortes se realizaron de manera seriada, en 20 series, se recogieron en portaobjetos polarizados (Thermo Scientific Superfrost Plus) y se almacenaron a -20 °C.

En ambos Estudios, las áreas de interés se seleccionaron con ayuda del atlas estereotáxico del cerebro de ratón de Franklin y Paxinos (1997).

3.2. Histología e inmunohistoquímica

En el Estudio 1 la caracterización neuromorfológica se llevó a cabo mediante procedimientos en *free floating*. En esta técnica, los tejidos se procesan flotando libremente en líquido en placas específicas para inmunohistoquímica. En cambio, en el Estudio 2, la caracterización neuromorfológica se llevó a cabo sobre tejidos adheridos a portaobjetos polarizados. Ambas técnicas garantizan la máxima penetración y homogeneidad en todos los tejidos sobre los que se realizan los estudios.

3.2.1. Tinción de Nissl

La estimación de parámetros morfológicos, tales como el área de la capa subgranular (SGZ) y el volumen del DG del hipocampo (ver apartado 3.3.), se realizaron sobre secciones teñidas con la tinción de Nissl, ya que permite delimitar de una forma sencilla dichas regiones.

En el Estudio 1 los cortes de hipocampo se lavaron en PB 0.1N (PB 0.1N: $NaH_2PO_4*H_2O$ 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 toloudina 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 °, 96 ° y dos

baños de 100 ° respectivamente). Después se pasaron por dos baños sucesivos con el disolvente orgánico xileno, también durante 2 minutos. Finalizada la exposición, las muestras se cubrieron con la resina sintética DPX (distrene 80, plastificante, xileno, Panreac) y un cubreobjetos y se dejaron secar durante 2 días (**figura 16**).

En el Estudio 2, el protocolo seguido fue el mismo, con la diferencia de que el tejido ya se encontraba adherido a portaobjetos polarizados. Por tanto, se lavaron los tejidos con PBS 1X en agitación y se procedió a su tinción y posterior deshidratación y montaje. En este caso el tiempo de tinción fue de 3 minutos ya que el tejido era mucho más fino.

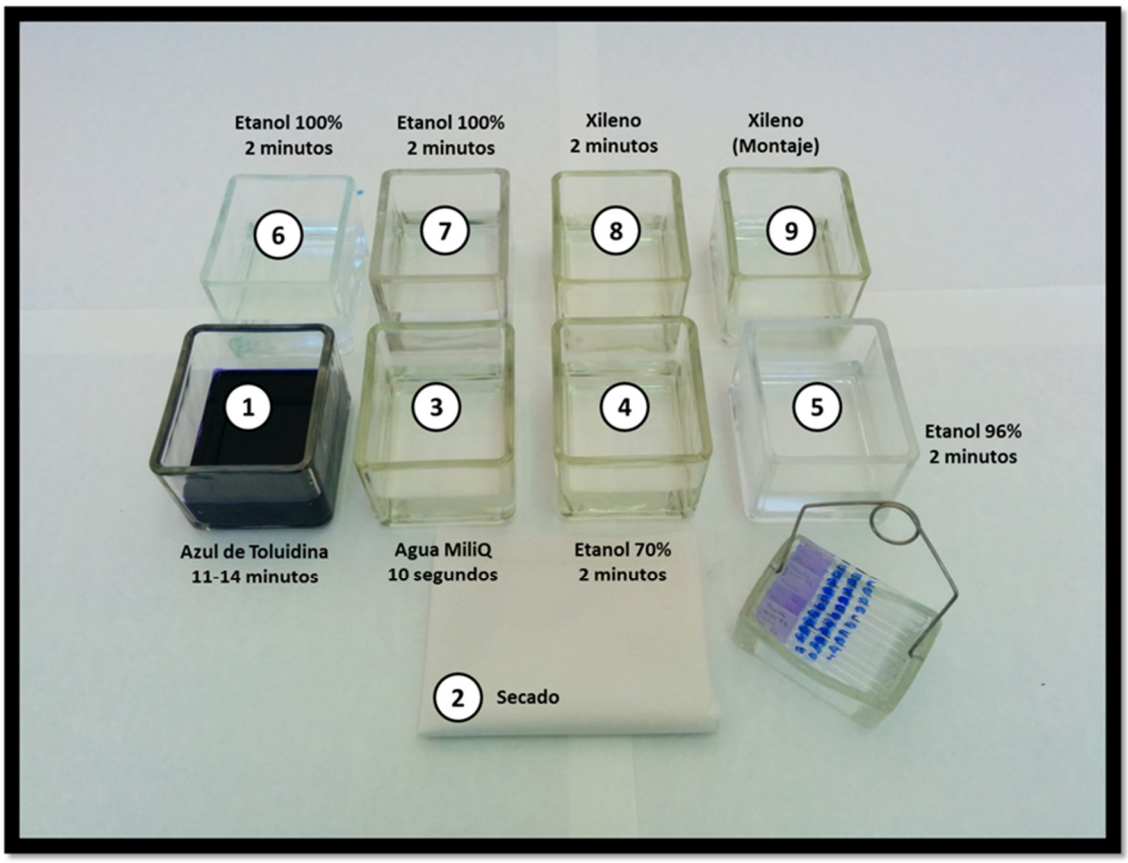

Figura 16. Esquema del protocolo utilizado para realizar la tinción de Nissl.

3.2.2. Tinción con DAPI

Para identificar el número de neuronas granulares maduras en el hipocampo se utilizó el marcador DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato). Un marcador nuclear que se une a las regiones de alta repetición de A=T del ADN en los cromosomas y que al excitarse con luz ultravioleta produce fluorescencia azul.

En el Estudio 1, se lavaron los cortes de hipocampo en PB 0.1N (PB 0.1N: $NaH_2PO_4*H_2O$ 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. Para eliminar la autofluorescencia debida a la acumulación de lipofuscina, un lipopigmento que se encuentra en altas concentraciones en ratones de edad avanzada o con signos de envejecimiento temprano, como el ratón TS, se realizó un tratamiento con el reactivo *Autofluorescence Eliminator Reagent* (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) a todos los tejidos. Para ello, se incubaron las secciones durante 5 minutos en etanol al 70 % y durante 5 minutos con el reactivo descrito. A continuación, se realizaron tres lavados de 1 minuto con etanol al 70 % y finalmente se lavaron los tejidos con PB 0.1N. 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.

En el Estudio 2 el protocolo fue similar al descrito en el Estudio 1 con algunas diferencias debido a que el tejido se encontraba adherido a portaobjetos polarizados. Las muestras se atemperaron y se delimitaron los tejidos con un rotulador hidrófobo. Se realizaron dos lavados de 5 minutos en PBS 1X en agitación. A continuación, se sumergieron los portaobjetos en una solución de PBS-TX 0.1 % durante 5 minutos, se dejaron secar y se dispusieron sobre una cámara húmeda en oscuridad. Se colocó sobre los tejidos una gota de PBS-TX 0.1 % con DAPI, 1:1000 durante 12 minutos. Se lavaron las muestras con PB 0.1N durante 5 minutos en agitación y, por último, se montaron con un cubreobjetos usando Gerbatol y se almacenaron a 4 °C y en oscuridad.

3.2.3. Inmunofluorescencia en tejido en suspensión

Las técnicas de inmunohistoquímica con fluorescencia se basan en el uso de anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos visibles en microscopios de fluorescencia o confocales. Este tipo de inmunofluorescencia en tejido en suspensión o *free-floating* solo se llevó a cabo en el Estudio 1.

Para valorar los efectos de la pauta de administración del fármaco RO4938581, descrita en el apartado 1.4.1., sobre la proliferación y supervivencia neuronal, se utilizaron varios anticuerpos primarios (**tabla 5**) que se unen a distintas proteínas que se expresan en poblaciones celulares en diferentes estadíos de diferenciación neuronal (**figura 17**).

3.2.4. Inmunohistoquímica de la densidad de células proliferativas (Ki67)

Ki67 es una proteína nuclear que se expresa en las células proliferativas en todas las fases del ciclo celular activo (G1, S, G2, M) y está ausente en las células con ciclo celular inactivo (G0). Por tanto, permite identificar la densidad de células en proliferación en la SGZ.

3.2.5. Inmunohistoquímica de la densidad de células en diferentes estadíos de proliferación (DCX y CLR)

La doblecortina (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 calretinina (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. Se realizó un doble marcaje con ambos anticuerpos con la intención de identificar varias poblaciones neurogénicas en el DG:

1. Población DCX positivas/CLR negativas → precursores neurogénicos.
2. Población DCX positivas/CLR positivas → neuronas postmitóticas en diferenciación.
3. Población DCX negativas/CLR positivas → es la población más diferenciada de las tres, pero transcurre durante un período muy breve y el número de neuronas de este tipo es muy reducido.

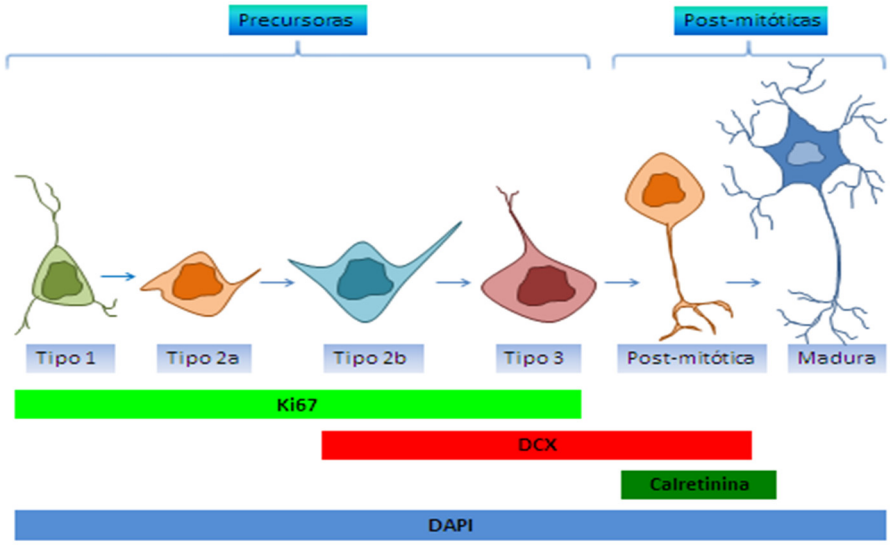

Figura 17. Fases de la neurogénesis en el hipocampo adulto y relación con la expresión de los marcadores utilizados en el estudio. Figura modificada de Corrales et al. (2014).

3.2.6. Inmunofluorescencia de los marcadores de sinapsis excitadoras e inhibidoras VGluT1 y VGAT

Para evaluar los efectos de RO4938581 sobre el balance inhibidor-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 VGluT1 (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 inhibidora.

Para realizar cada uno de los experimentos de inmunofluorescencia descritos anteriormente (ki67, DCX, CLR, VGluT1 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 BSA (Sigma-Aldrich) al 1 %, para bloquear las uniones inespecíficas. Se incubaron las secciones con ambos anticuerpos primarios (**tabla 5**) 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 6**) 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. Para eliminar la autofluorescencia debida a la acumulación de lipofuscina se llevó a cabo el protocolo descrito en el apartado 3.2.2. Por último se montaron los cortes en portaobjetos polarizados, se cubrieron con cubreobjetos utilizando Gerbatol y se almacenaron a 4 °C y en oscuridad.

Tabla 5. 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 6. Anticuerpos secundarios utilizados para la inmunofluorescencia

Inmuno-fluorescencia	Anticuerpo secundario	Casa Comercial	Origen
Ki67 CLR	Anti-conejo Alexa Fluor® 488	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)	Burro
DCX VGAT	Anti-cabra Alexa Fluor® 594	Invitrogen	Burro
VGluT1	Anti-cobaya Alexa Fluor ® 488	Invitrogen	Cabra

3.2.7. Inmunohistoquímica con DAB

En el Estudio 2, para evaluar el efecto de la administración prenatal de ácido linolénico, ácido oleico y curcumina sobre la proliferación celular y cuantificar la cantidad de precursores neuronales en la SGZ del hipocampo, se utilizó el marcador celular BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina) que es un nucleótido sintético análogo de la timidina. El BrdU se incorpora a la cadena de ADN y, debido a la analogía que comparte con la timidina, permite una sustitución casi total de los nucleótidos de la misma durante la división celular.

En este caso, la técnica se llevó a cabo sobre tejido adherido a portaobjetos polarizados y se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado para revelar el marcaje de la proteína de interés.

Se seleccionó de manera aleatoria 1 de las 20 las series y se dejaron atemperar las muestras. Se delimitaron los tejidos con un rotulador hidrófobo y se realizó un lavado de 10 minutos de PBS 1X en agitación seguido de 5 lavados de 10 minutos en PBS-TX 0.1 % para permeabilizar el tejido. A continuación, se inactivó la peroxidasa endógena del tejido con peróxido de hidrogeno al 0.3 % en PBS 1X y se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS-TX 0.1 %. Se incubaron las muestras durante 30 minutos en HCL 2N a 37 °C y, posteriormente, se lavaron durante 5 minutos en PBS 1X. A continuación, los tejidos se lavaron 2 veces durante 10 minutos con tampón Borato 0,1M y 3 veces durante cinco minutos en PBS-TX 0.1 %. Se dejaron secar las muestras y se colocaron en una cámara húmeda para llevar a cabo el bloqueo de las uniones inespecíficas, preincubando los tejidos con una solución de suero de cabra al 3 % en PBS-TX 0.1 % durante una hora. A continuación, se retiró el exceso de PBS-TX con suero de cabra al 1 % y se incubaron las secciones en la cámara húmeda con el anticuerpo primario Anti-BrdU (1:100, **tabla 7**) en PBS-TX con suero de cabra al 3 % durante 24 horas a 4 °C.

Al día siguiente se realizaron de nuevo lavados con PBS-TX y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado (1:200; **tabla 7**) en PBS-TX con suero de cabra al 1 % durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras 4 lavados de 10 minutos con PBS-TX, los cortes se trataron durante 45 minutos con el complejo Avidina-Biotina Peroxidasa (Estándar Vecstain ABC kit, Vector Laboratories). Posteriormente, se realizaron lavados

con PBS 1X. El revelado de las muestras se llevó a cabo utilizando la especificidad de la reacción de peroxidación en presencia de cromógeno 3,3' Diaminobenzidina (DAB). Finalmente, se deshidrataron los tejidos pasándolos por alcoholes de gradación ascendente y por un baño de xileno y se cubrieron utilizando la resina sintética DPX.

Tabla 7. **Anticuerpos utilizados en la inmunohistoquímica con peroxidasa**

Anticuerpos	Casa Comercial	Origen
Anti-BrdU (Anticuerpo primario)	Sigma	ratón
Anti-ratón biotinilado (Anticuerpo secundario)	Vitro (Jackson InmunoResearch)	cabra

3.3. Recuentos celulares y técnicas estereológicas

3.3.1. Evaluación del volumen del DG y del área de la SGZ del hipocampo

Para llevar a cabo la determinación del volumen del DG y del área de la SGZ se tomaron fotografías de estas regiones marcadas con la tinción de Nissl en un microscopio óptico (Zeiss Axioskop 2 plus, Carl Zeiss Microscopy, LLC, USA) a una magnificación de 4x en el caso del Estudio 1 y de 10X en el caso del Estudio 2 y se empleó el método estereológico de Cavalieri descrito por Llorens-Martin et al. (2006).

El principio de Cavalieri es una ley geométrica que permite determinar la diferencia de volumen entre dos cuerpos. Este método se basa en la estimación del volumen de un objeto mediante la suma de las áreas de las secciones que conforman una serie y la multiplicación de esta suma de las áreas por la distancia constante que los separa.

En el Estudio 1, como se mencionó anteriormente, se obtuvieron 9 series de secciones de 50 µm de grosor del hipocampo. Por tanto, la distancia entre sección y sección de una misma serie fue de 450 µm.

En el Estudio 2, se cortaron 20 series de secciones de 8 µm de grosor del hipocampo, por lo que la distancia entre sección y sección de una misma serie fue de 160 µm.

Se midió el área del DG y la longitud de la SGZ en cada una de las secciones con ayuda del software ImageJ NIH (versión 1.33; http://rsb.info.nih.gov/ij) y de una tableta digital (Mouse Pen 8 x 6, Genius, taipei, Taiwan). Con las medidas halladas se estimaron los parámetros a evaluar aplicando las siguientes formulas:

$$VDG = d * \Sigma Ai \qquad ASGZ = d * \Sigma Li$$

Donde "d" es la distancia entre cada sección de una serie, ΣAi el sumatorio de todas las áreas medidas y ΣLi el sumatorio de todas las longitudes.

3.3.2. Cuantificación de los precursores neurales en la SGZ del DG en el hipocampo.

Para la identificación de las células proliferativas en la SGZ, en el Estudio 1 se empleó la proteína Ki67 (apartado 3.2.2) y en el Estudio 2 BrdU (apartado 3.2.7). En ambos casos el procedimiento llevado a cabo fue el mismo. Se cuantificaron los progenitores por serie visualmente, con un microscopio óptico en el caso de las células BrdU positivas y de fluorescencia en el caso de las células Ki67 positivas (Zeiss Axioskop 2 plus, Carl Zeiss Microscopy, LLC, USA) con un objetivo de 40x. La presencia de progenitores en proliferación se visualizó con el enfoque micrométrico en todo el espesor del tejido, sin necesidad de utilizar planos focales.

Para determinar la densidad de los precursores neuronales se empleó la variación del disector óptico (West y Gundenser, 1900) descrita por Trejo et al. (2001). Para hallar la densidad de precursores neuronales de cada animal se dividió el número total de células obtenido por cada animal en una serie entre el área de su SGZ calculado previamente.

3.3.3. Cuantificación de las poblaciones celulares de la SGZ en diferentes fases de diferenciación

Como se mencionó anteriormente en el apartado 3.2.2, en el Estudio 1, para determinar los distintos progenitores granulares del DG y el estadio de diferenciación en el que se encuentran se utilizaron los marcadores DCX y CLR. Por tanto, se identificaron tres tipos diferentes de poblaciones neuronales asociadas a diferentes fases de diferenciación.

Para medir la densidad de estas poblaciones celulares se empleó la variación del método del disector físico descrito por Llorens-Martin et al. (2006). Así, por cada animal, se ubicaron aleatoriamente 6 disectores ópticos en la SGZ con un microscopio confocal (Leica TCS SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), utilizando un objetivo de 63x y un zoom de 2.46. Se colocaba un lado del disector de dimensiones 100.01 x 100.01 µm paralelamente a la SGZ, siendo por tanto la longitud de la misma 100.01 µm. Asimismo, en cada disector se examinaron 11 planos focales a lo largo de 17.204 µm, con una separación de 1.72 µm entre ellos. El recuento de las células se realizó utilizando la técnica del disector en forma de U, siendo la base de éste la capa subgranular y los brazos los límites laterales de la fotografía. Las células se contaron con el software de análisis ImageJ. A medida que las células desaparecían a través de los planos focales solo se cuantificaban aquellas en las que el núcleo fuera visible, independientemente del borde que tocaran y marcando cada una para asegurarse de que no se contaban más de una vez. La densidad celular se obtuvo dividiendo el número de células contadas entre el área de la SGZ contenida en el disector. La densidad equivalente a cada tipo celular se determinó con la media de los 6 disectores.

3.3.4. Cuantificación de neuronas granulares en el DG

Dado que las neuronas granulares son el tipo más abundante de neuronas maduras en el DG y debido a su fácil distinción de los progenitores neuronales por su ubicación y su morfología nuclear, se estimó su densidad como medida indirecta de las neuronas maduras del DG.

La cuantificación de células DAPI positivas se llevó a cabo usando el método del disector físico acoplado a microscopio confocal (Leica TCS SPE, Leica Microsystems) descrito por Llorens-Martín et al. (2006).

En cada animal se seleccionaron aleatoriamente seis puntos en el interior de la GCL donde se ubicaron los disectores. Se utilizó un objetivo de 63x y un zoom de 2.3, siendo las dimensiones de cada disector 7.175 X 75.91 X 75.91 µm. En el Estudio 1, en cada punto se tomó una serie de 10 planos focales separados por 0.8 µm, distancia suficiente para que cada célula aparezca en dos planos consecutivos y en el Estudio 2, una serie de 10 planos focales separados por 0.2 µm, distancia suficiente para que cada célula

aparezca en dos planos consecutivos. El recuento celular se realizó con el programa ImageJ y siguiendo los principios de Sterio (1984), es decir, tomando pares de imágenes y considerando alternativamente una imagen como sección de referencia y la otra como sección de muestra. Sólo se contabilizaron aquellas células que se encontraban en el plano focal de muestreo pero que no aparecían en el plano de referencia. Se excluyeron aquellas células que tocaban la parte inferior y dos de los lados del disector. Para hallar la densidad de neuronas granulares se dividió el número de células contadas por el volumen del disector. Para estimar la densidad por animal se calculó la media de los 6 disectores.

3.3.5. Cuantificación de la densidad de sinapsis GABAérgicas y Glutamatérgicas en el hipocampo

La técnica se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Trejo et al. (2007). Por cada animal se seleccionaron aleatoriamente 4 puntos en la capa molecular (ML) del DG en la zona más externa de la capa de células granulares. En cada punto se tomó una imagen de los marcadores VGluT1 y VGAT por separado. Las fotografías se realizaron con un microscopio confocal (Leica TCS SP5, Leica Microsystems), utilizando el objetivo de 63x con un zoom de 9 y una resolución de 1024 x 1024. El análisis de las imágenes se realizó con el software ImageJ. Tras convertirlas a escala de grises, para mejorar el contraste entre señal y ruido, se realizó un círculo de referencia con un área de 325 μm^2. Se midió el área marcada positivamente por VGluT1 o por VGAT en esta región circular aplicando el mismo umbral en todos los casos. Finalmente, los resultados se expresaron como la media del porcentaje de área ocupada por la señal positiva. Para determinar el balance relativo de excitación e inhibición para en cada animal se dividió el valor del porcentaje de excitación hallado entre el porcentaje de inhibición.

4. Análisis estadístico de los resultados

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

Los datos del laberinto Acuático de Morris se analizaron usando MANOVAs de Medias Repetidas (‘sesión’ x ‘cariotipo’ x ‘tratamiento’ o ‘ensayo’ x ‘cariotipo’ x ‘tratamiento’).

Los datos del resto de estudios conductuales y de la caracterización neuromorfológica se analizaron mediante MANOVAs (‘cariotipo x tratamiento’) para evaluar el efecto de estos factores sobre cada variable dependiente. Las medias de cada grupo experimental fueron comparadas *post hoc* mediante la prueba de Bonferroni.

Resultados

1. Estudio 1. Efecto de la administración a largo plazo de un modulador alostérico negativo para la subunidad α5 del receptor $GABA_A$, sobre los déficits cognitivos y neuromorfológicos del ratón Ts65Dn

En este primer estudio el objetivo fue evaluar si los efectos beneficiosos sobre las alteraciones cognitivas y neuromorfológicas del ratón TS producidas por la administración crónica de RO4938581 se mantenían a largo plazo tras la retirada del fármaco. Para ello se trató a dos grupos de animales TS y CO con este NAM durante 12 semanas (8 semanas antes de las pruebas conductuales y 4 durante la evaluación conductual) y a otros dos grupos de ratones TS y CO durante 4 semanas, seguidas de 4 semanas de administración diaria de vehículo antes de las pruebas conductuales y otras 4 semanas del mismo tratamiento durante la evaluación conductual.

1.1. Efectos sobre las alteraciones cognitivas y comportamentales del ratón TS

1.1.1. Cognición

Para evaluar el efecto de las distintas pautas de administración del fármaco sobre la cognición de los ratones TS se utilizó la prueba de condicionamiento de miedo y la del laberinto acuático de Morris.

1.1.1.1. Prueba de condicionamiento de miedo (CFC)

Esta prueba permite evaluar la memoria de la asociación entre un estímulo aversivo y uno auditivo, proceso que depende de la adecuada función de la amígdala, y la memoria de la asociación entre un estímulo aversivo y un contexto, que es fundamentalmente dependiente del hipocampo.

En la prueba de la asociación tono-descarga se encontró una tendencia de los animales TS tratados con vehículo para recordar peor la asociación entre el estímulo auditivo y la descarga eléctrica. Este déficit fue menor en los animales TS y CO tratados con RO4938581, ya que pasaban más tiempo en estado de inmovilización que los tratados con vehículo (**figura 18**) aunque estos efectos no alcanzaron la significación estadística (ANOVA 'cariotipo': $F_{(1,83)}$=2.62, p=0.20, 'tratamiento': $F_{(2,83)}$=1.61, p=0.20, 'cariotipo x tratamiento': $F_{(2,83)}$=0.72, p=0.48, **figura 18**). Sin embargo, los análisis *post hoc*

mostraron que el tratamiento durante 12 semanas con el fármaco consiguió rescatar de manera significativa la memoria de asociación entre la descarga eléctrica y el tono en los animales TS (p=0.036).

En esta prueba los tres grupos de animales trisómicos también mostraron un déficit en su capacidad para recordar la asociación entre un contexto visuo-espacial (paredes rayadas) y el estímulo aversivo (ANOVA 'cariotipo': $F_{(1,83)}$=7.89, p=0.006). El tratamiento crónico con RO4938581 durante 12 ó 4 semanas no consiguió rescatar este déficit (ANOVA 'tratamiento': $F_{(2,83)}$= 0.60, p=0.54, 'cariotipo x tratamiento': $F_{(2,83)}$=0.84, p=0.43, **figura 18**).

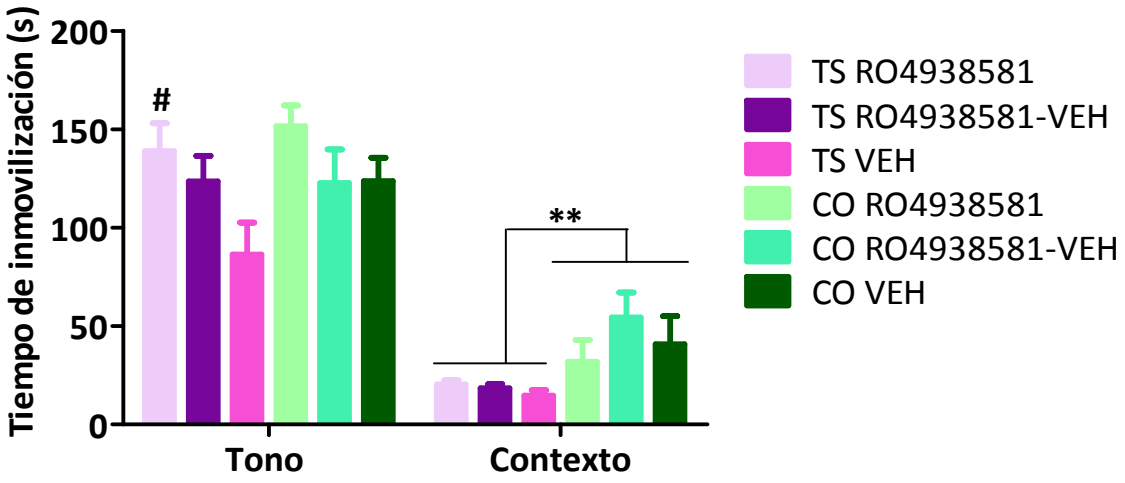

Figura 18. El tratamiento con RO4938581 mejoró la memoria de asociación tono-descarga de los ratones TS, pero no consiguió rescatar los déficits de la memoria asociativa contextual de los animales TS. Medias ± E.E.M. del tiempo de inmovilidad durante la sesión de evaluación de la memoria de asociación tono-descarga y de la memoria de asociación contexto-descarga en la prueba del CFC de los animales TS y CO tratados con el fármaco o vehículo durante el tiempo correspondiente. #: p<0.05 TS RO4938581 *vs.* TS VEH. Pruebas de Bonferroni. **: p<0.01 TS *vs*. CO ANOVA 'cariotipo'.

1.1.1.2. Laberinto acuático de Morris (MWM)

Por otro lado, se utilizó el laberinto acuático de Morris para evaluar el efecto de RO4938581 sobre el aprendizaje y la memoria espacial dependiente del hipocampo. Para ello, se usó un protocolo de MWM modificado que permite analizar la memoria de referencia, la memoria de trabajo y el aprendizaje procedimental de los diferentes

grupos de animales. La **tabla 8** muestra los resultados estadísticos de cada variable evaluada.

a) Memoria de referencia

Para evaluar este tipo de memoria se examinó el aprendizaje de la posición de la plataforma a lo largo de las 12 sesiones de adquisición analizando las latencias de escape de los animales. Como muestra la **figura 19A,** todos los animales, independientemente del tratamiento que recibieron, mostraron una reducción del tiempo que utilizaron para localizar la plataforma a través de las sucesivas sesiones de adquisición ($p<0.001$, **tabla 8**), lo que indica un aprendizaje de la posición de la misma a lo largo de los días que duró la prueba. A pesar de ello, los ratones TS mostraron un déficit en su memoria de referencia, ya que presentaban más dificultades (mayores latencias de llegada a la plataforma) que los ratones CO para aprender y recordar la posición de la plataforma durante estas sesiones ($p<0.001$; **figuras 19A** y **19C**).

Por otro lado, ambas pautas de administración de RO4938581 mejoraron de manera significativa el rendimiento de los animales TS ($p=0.035$, **tabla 8**, **figura 19A**). De hecho, cuando se analizaron por separado los grupos de animales TS y CO, se observó que las dos pautas de administración del NAM mejoraron las capacidades cognitivas de los animales TS ($p=0.009$, **tabla 8**, **figuras 19E** y **19F**). Sin embargo, estos tratamientos no tuvieron ningún efecto sobre el rendimiento de los animales CO ($p=0.51$, **tabla 8**, **figura 19F**).

Aunque el tratamiento con RO4938581 durante 12 semanas no normalizó por completo el rendimiento de los animales TS (**figura 19D**), sus latencias para alcanzar la plataforma no difirieron significativamente de las de los animales CO tratados con vehículo ($p=0.28$, **tabla 8**, **figura 19D**).

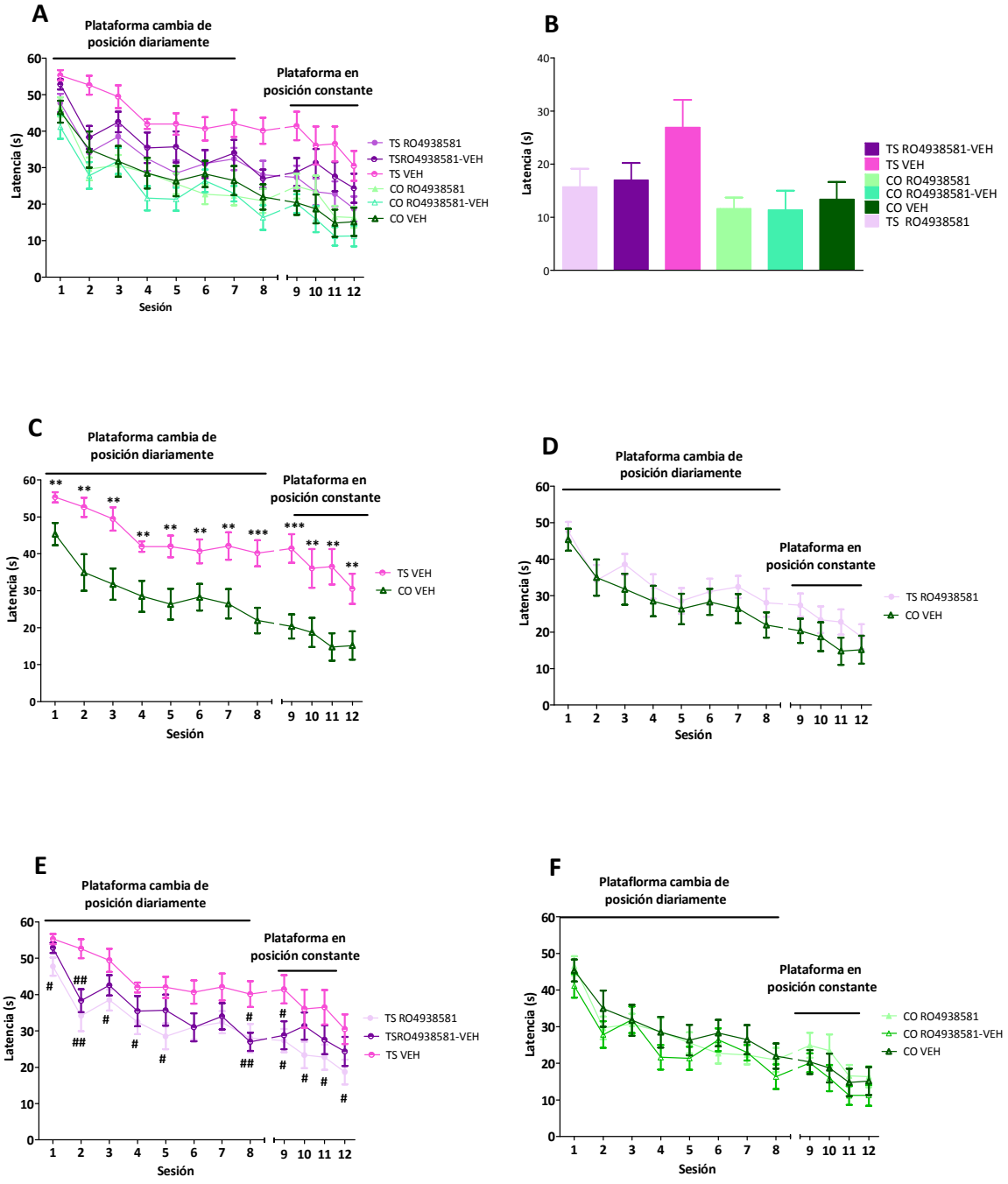

Figura 19. El tratamiento con RO40938581 mejoró la memoria de referencia del ratón TS. Medias ± E.E.M. de la latencia de los 6 grupos de animales para alcanzar la plataforma durante las 12 sesiones de adquisición (A) y las 4 sesiones guiadas (B), durante las sesiones de adquisición de los animales TS y CO tratados con vehículo (C), de los TS tratados con RO40938581 y los CO tratados con vehículo (D) y de los 3 grupos de ratones TS (E) y CO (F) tratados con RO4938581 o vehículo. **: p<0.01, ***: p<0.001 TS *vs.* CO; #: p<0.05, ##: p<0.01 VEH *vs.* RO4938581 o *vs*. RO4938581-VEH. Pruebas de Bonferroni tras ANOVAs significativos.

A su vez, los animales tratados con RO4938581 durante 4 semanas mostraron latencias ligeramente más altas para alcanzar la plataforma que los tratados durante las 12 semanas, aunque el primer grupo todavía mostró un mejor rendimiento que los animales TS tratados con vehículo. Por lo tanto, el tratamiento con este fármaco durante 4 semanas ejerció un efecto a largo plazo que fue evidente 8 semanas después de la interrupción del tratamiento.

b) Sesiones Guiadas

Con el fin de comprobar si existían alteraciones motoras o motivacionales que pudiesen afectar la ejecución de los ratones en esta prueba, se realizaron 4 sesiones de aprendizaje guiado. A lo largo de estas sesiones no se encontraron diferencias significativas en la latencia de llegada a la plataforma cuando ésta era visible entre los 6 grupos de animales objeto de estudio (p=0.28; **tabla 8**, **figura 19B**).

c) Memoria de trabajo

Para evaluar la memoria de trabajo se analizó la latencia para localizar la plataforma de los diferentes grupos de ratones en cada ensayo a través de las sesiones (para cada ensayo se obtuvo la media de la latencia de llegada a la plataforma en las 8 sesiones). Los resultados mostraron que todos los grupos experimentales redujeron la latencia de llegada a la plataforma a lo largo de los ensayos (p<0.001, **tabla 8**, **figura 20A**). Es decir, en cada sesión todos los grupos aprendían la nueva posición de la plataforma. Sin embargo los animales TS tratados con vehículo presentaban un deterioro en su memoria de trabajo en relación con los ratones CO con el mismo tratamiento (p=0.002, **tabla 8**, **figura 20B**).

Las dos pautas de tratamiento crónico con RO4938581 mejoraron significativamente la memoria de trabajo de los de los animales TS (p=0.035, **tabla 8**, **figura 20D**), pero no la de los ratones CO (p=0.76, **tabla 8**, **Figura 20E**).

El análisis de cada curva de aprendizaje por separado reveló que los animales TS tratados con vehículo no redujeron su latencia de llegada para alcanzar la plataforma, es decir no aprendieron la localización de la misma a lo largo de los ensayos (p=0.42, **figura 20D**).

Sin embargo, los ratones TS tratados con RO4938581 sí mejoraron significativamente su rendimiento a lo largo de los ensayos, pero este efecto fue más marcado en los animales TS tratados durante 12 semanas ($p=0.003$) que en los tratados durante 4 semanas ($p=0.036$). Este resultado sugiere que, a pesar de que el efecto beneficioso de RO4938581 persiste 8 semanas después de interrumpir su administración, es más eficaz si se administra de forma continuada.

La administración crónica de RO4938581 durante 12 semanas no normalizó por completo el rendimiento de los animales TS. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la curva de aprendizaje de estos ratones y la de los controles tratados con vehículo ($p=0.42$, **tabla 8**, **figura 20C**).

Por otro lado, el análisis de las curvas de aprendizaje de los animales CO reveló que todos ellos redujeron significativamente su latencia para alcanzar la plataforma a lo largo de los ensayos ($p<0.001$) y que no hubo diferencias significativas entre el rendimiento de los 3 grupos de animales bajo los diferentes tratamientos ($p=0.74$, **tabla 8**, **figura 20E**).

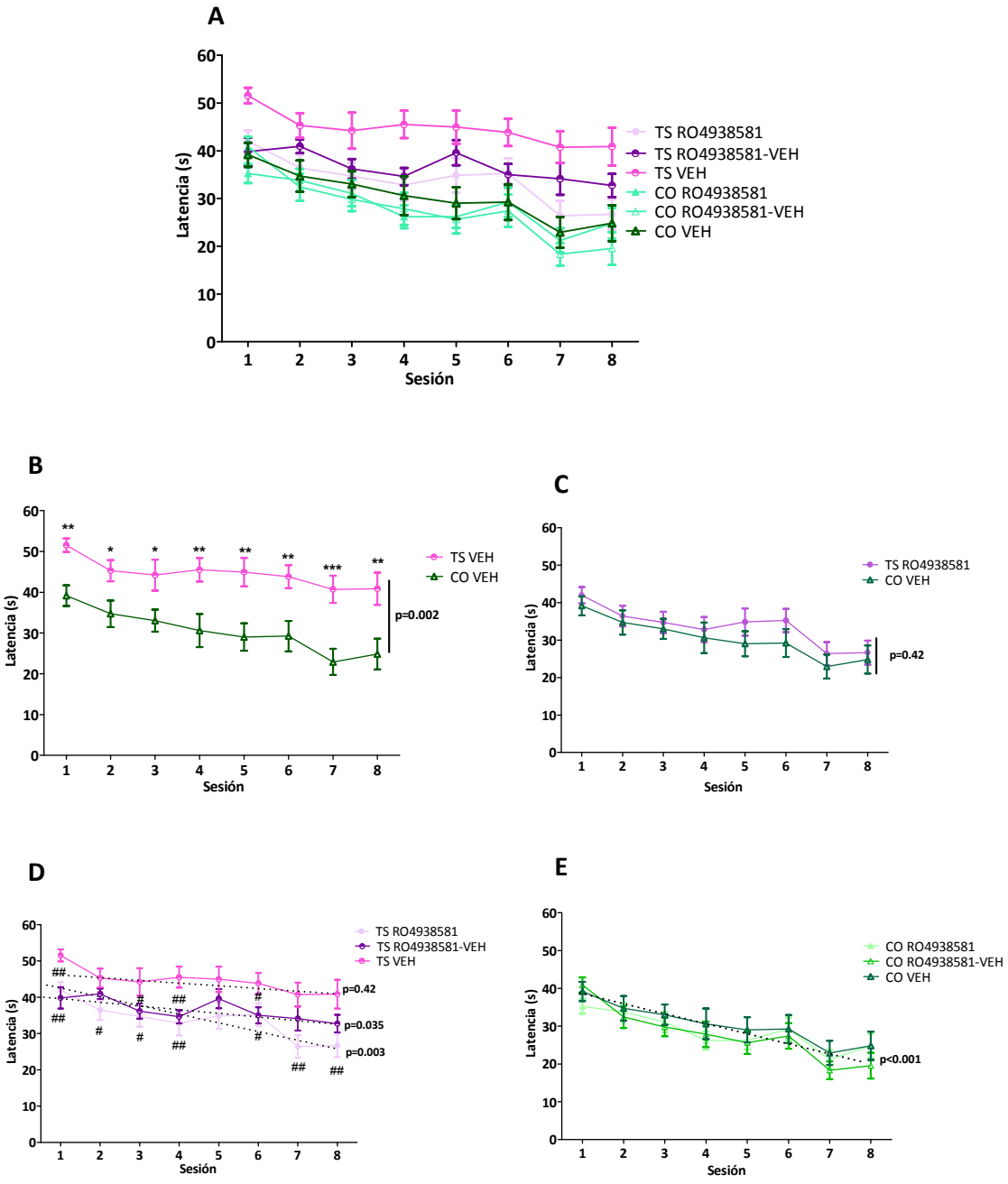

Figura 20. El tratamiento con RO40938581 mejoró la memoria de trabajo del ratón TS. Medias ± E.E.M. de las latencias para alcanzar la plataforma durante los ocho ensayos de todas las sesiones de adquisición de todos los grupos de animales (A), de los ratones TS y los CO tratados con vehículo (B), de los TS tratados con RO40938581 y los CO tratados con vehículo (C), de los 3 grupos de ratones TS (D) y CO (E) tratados con RO40938581 o vehículo. *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 TS vs. CO; #: p<0.05, ##: p<0.01 VEH *vs*. RO4938581 o *vs*. RO4938581-VEH. Pruebas de Bonferroni tras ANOVAs significativos. El análisis *post-hoc* (valores de p para MR ANOVA) de la curva de aprendizaje de cada grupo se muestra a la derecha de las figuras D y E. Las diferencias en la ejecución de los ratones TS y CO tratados con vehículo y la de los TS tratados con RO4938581 durante 12 semanas y los CO tratados con vehículo se muestran a la derecha de las figuras B y C respectivamente (MANOVAs de medidas repetidas).

d) Ensayo de retirada de la plataforma

Durante el ensayo de retirada de la plataforma los animales TS tratados con vehículo mostraron un claro déficit en su capacidad para recordar la posición de la plataforma, ya que no hubo diferencias significativas en el porcentaje de tiempo que estuvieron nadando en cada uno de los cuatro cuadrantes ($p=0.068$, **tabla 8**, **figura 21A**). Sin embargo, los tres grupos de animales CO tratados con RO4938581 o con vehículo presentaron una buena memoria espacial, ya que todos ellos mostraron preferencia por el cuadrante entrenado respecto al resto de los cuadrantes (CO RO4938581: $p=0.001$, CO RO4938581-VEH: $p<0.001$ y CO VEH: $p<0.001$, **tabla 8**, **figura 21A**).

La administración crónica de RO4938581 a los animales TS incrementó significativamente su preferencia por el cuadrante entrenado cuando fue administrado durante 12 semanas ($p<0.001$, **tabla 8**, **figura 21A**). Sin embargo, aunque los ratones TS tratados durante 4 semanas también pasaron un porcentaje mayor de tiempo en el cuadrante entrenado que los tratados con vehículo, su preferencia por esta zona no fue tan marcada ya que también pasaron un alto porcentaje de tiempo en uno de los cuadrantes adyacentes al entrenado ($p<0.001$, **tabla 8**, **figura 21A**). Estos resultados sugieren que ambos tratamientos mejoraron la memoria espacial de los ratones TS pero que el efecto fue mayor cuando no se discontinuó la administración de RO4938581.

Por otro lado, a pesar de que el MANOVA no mostró un efecto significativo del cariotipo o del tratamiento en el número de cruces sobre la posición de la plataforma o en el número de entradas en el cuadrante entrenado, los análisis *post-hoc* indicaron una tendencia de los animales TS tratados con vehículo a realizar menos cruces y entradas en el cuadrante entrenado que los ratones CO. Estos análisis también mostraron que el tratamiento RO4938581 recuperó la memoria espacial de los ratones TS (**Figuras 21B** y **21C**, **tabla 8**), ya que ambas pautas de administración de este NAM normalizaron el número de cruces sobre la plataforma. Además el tratamiento con RO4938581 durante 12 semanas normalizó el número de entradas que los animales TS realizaron en el cuadrante entrenado.

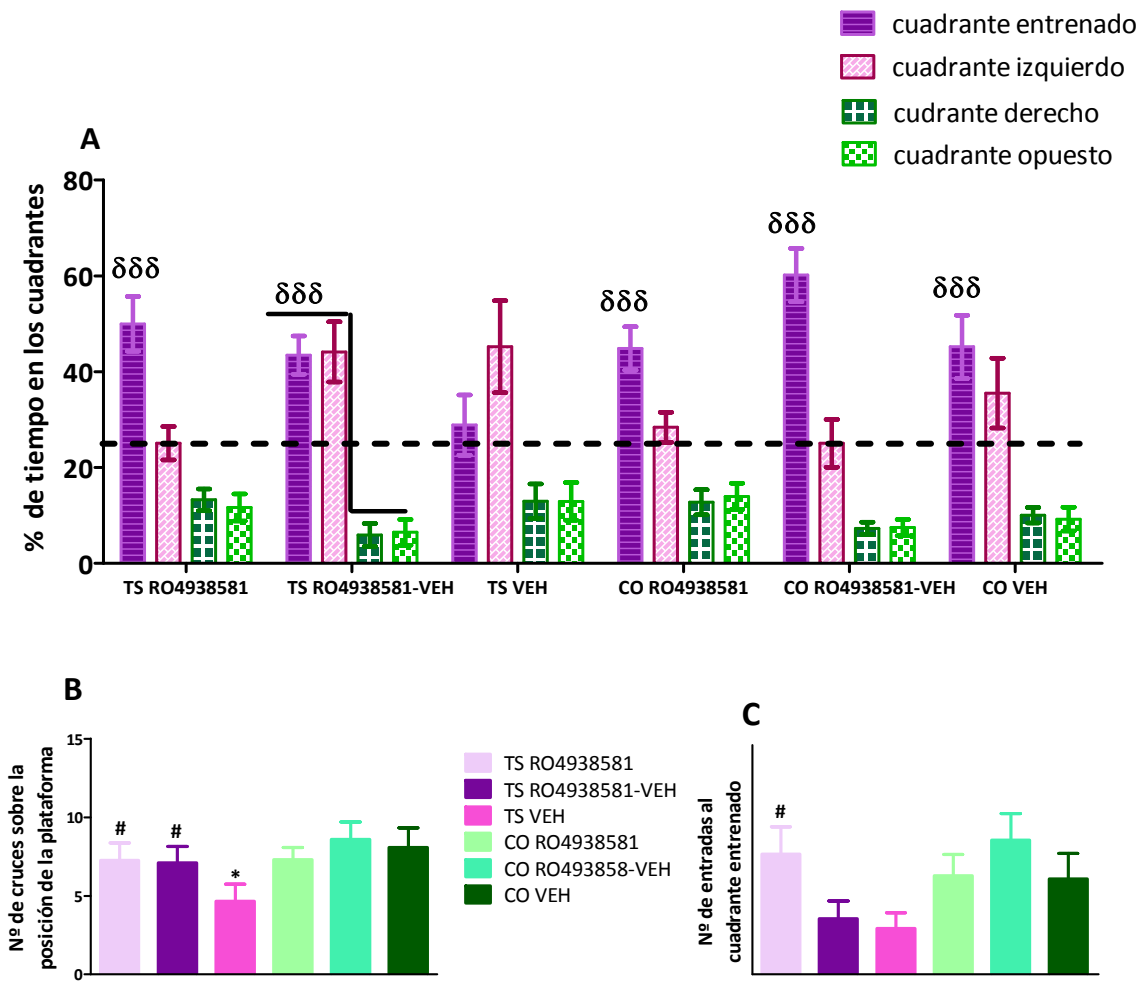

Figura 21. La administración de RO40938581, especialmente durante 12 semanas, mejoró la memoria de la posición de la plataforma en el ratón TS. Medias ± E.E.M. del porcentaje de tiempo que los animales estuvieron nadando en cada uno de los cuadrantes durante el ensayo de retirada de la plataforma (A), del número de cruces sobre la posición de la plataforma (B) y del número de entradas en el cuadrante entrenado (C) en los seis grupos de ratones. δδδ: $p<0.001$ cuadrante entrenado *vs*. resto de cuadrantes. *: $p<0.05$ TS *vs*. CO; #: $p<0.05$ VEH *vs*. RO4938581 o *vs*. RO4938581-VEH. Pruebas de Bonferroni tras ANOVAs significativos. La barra punteada de la figura A señala el nivel de ejecución correspondiente a la casualidad (25 % del tiempo).

Por tanto, estos resultados sugieren que la memoria espacial del ratón TS se ve beneficiada en mayor medida cuando se administra el fármaco de manera continuada durante 12 semanas que cuando se deja de administrar durante 8 semanas.

f) Tigmotaxis

Para evaluar si los animales estaban usando una buena estrategia de búsqueda de la plataforma se analizó el comportamiento tigmotáctico de los ratones cuantificando el tiempo que nadaban cerca de las paredes del laberinto. Todos los animales redujeron su comportamiento tigmotáctico a lo largo de las sesiones ($p<0.001$, **tabla 8**, **figura 22A**).

Los animales TS nadaron en la periferia del aparato un porcentaje mayor de tiempo que los CO ($p=0.001$, **tabla 8**, **figura 22A**). La administración de RO4938581 durante 12 semanas redujo significativamente la tigmotaxis de los ratones TS ($p=0.026$, **tabla 8**, **figura 22B**). Aunque el tratamiento con este NAM durante 4 semanas también produjo una tendencia a reducir esta conducta en los ratones TS, esta tendencia no alcanzó la significación estadística ($p=0.32$, **tabla 8**, **figura 22B**).

Por otro lado, la administración de RO4938581 no tuvo ningún efecto sobre el porcentaje de efecto que pasaron los ratones CO en la periferia del aparato ($p=0.63$, **tabla 8**, **Figura 22C**).

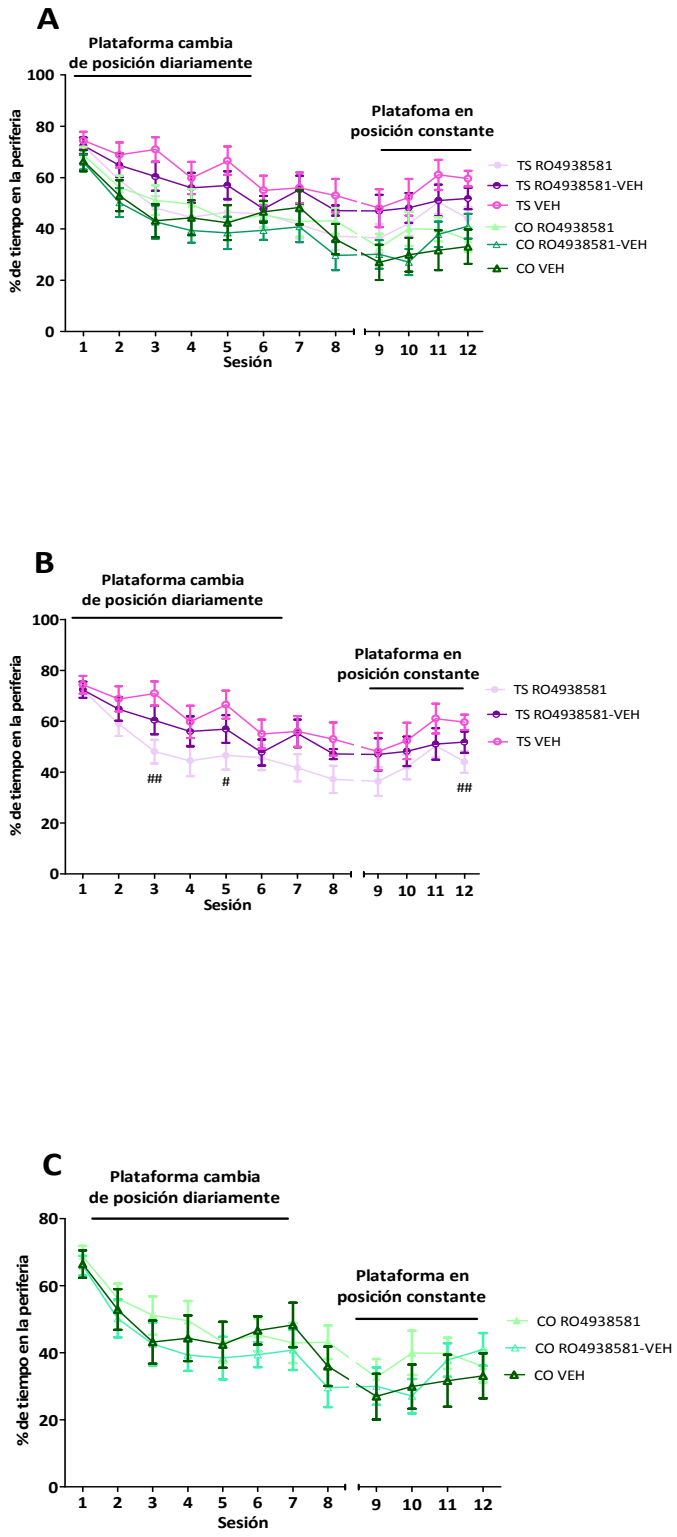

Figura 22. El tratamiento con RO40938581 redujo el comportamiento tigmotáctico del ratón TS. Medias ± E.E.M. del porcentaje de tiempo que pasaron en la periferia del laberinto durante las sesiones de adquisición todos los grupos de animales (A), los 3 grupos de ratones TS (B) y CO (C) tratados con RO40938581 o con vehículo. #: $p<0.05$, ##: $p<0.01$ RO4938581 *vs*. VEH. Pruebas de Bonferroni tras ANOVAs significativos.

Tabla 8. Laberinto acuático de Morris. Valores F y p de los MANOVAs MR y análisis *post hoc* de cada variable independiente analizada durante las sesiones de adquisición y guiadas del MWM. Los valores estadísticamente significativos (p<0.05) se presentan en negrita

			'Sesión'	**'Cariotipo'**	**'Tratamiento'**	**'Cariotipo x tratamiento'**
Memoria de referencia (S1-S12)	MANOVA MR 'cariotipo x tratamiento'		**$F_{(11,83)}$= 31.59, p<0.001**	**$F_{(1,83)}$= 27.73, p<0.001**	**$F_{(2,83)}$= 3.48, p=0.035**	$F_{(2,83)}$= 2.58, p=0.082
	Comparaciones *post hoc* entre curvas de aprendizaje	TS VEH *vs.* CO VEH		**$F_{(1,22)}$= 16,71, p<0,001**		
		TS RO4938581-VEH *vs.* C0 VEH				**$F_{(1,23)}$= 5.12, p=0.033**
		TS RO4938581 *vs.* CO VEH				$F_{(1,27)}$= 1.00, p=0.32
		TS RO4938581 *vs.* TS VEH			**$F_{(1,25)}$= 8.01, p=0.009**	
		TS RO4938581-VEH *vs.* TS VEH			**$F_{(1,23)}$= 4.00, p=0.05**	
		CO RO4938581 *vs.* C0 VEH			$F_{(1,28)}$= 0.00, p=0.987	
		CO 4938581-VEH *vs.* C0 VEH			$F_{(1,28)}$= 0.243, p=0.62	
		TS RO4938581 TS RO4938581-VEH *vs.* TS VEH			**$F_{(2,38)}$= 5.37, p=0.009**	
		CO 4938581 CO 4938581-VEH *vs.* C0 VEH			$F(_{2,45})$= 0.68, p=0.51	

Tabla 8 (Continuación)

Memoria de trabajo (E1-E8)	MANOVA MR 'cariotipo x tratamiento'		**$F_{(7,83)}$= 33.59 P<0.001**	**$F_{(1,83)}$= 21.15 P<0.001**	**$F_{(2,83)}$= 3.50 P=0.035**	$F_{(2,83)}$= 1.56 P=0.21
	Comparaciones *post hoc* entre curvas de aprendizaje	TS VEH *vs.* CO VEH		**$F_{(1,22)}$= 12.93, p=0.002**		
		TS RO4938581-VEH *vs.* C0 VEH				$F_{(1,25)}$= 3.25, p=0.083
		TS RO4938581 *vs.* CO VEH				$F_{(1,27)}$= 0.64, p=0.42
		TS RO4938581 *vs.* TS VEH			**$F_{(1,25)}$= 8.43, p=0.008**	
		TS RO4938581-VEH *vs.* TS VEH			**$F_{(1,23)}$= 7.28, p=0.01**	
		CO RO4938581 *vs.* C0 VEH			$F_{(1,28)}$= 0.29, p=0.59	
		CO 4938581-VEH *vs.* C0 VEH			$F_{(1,28)}$= 0.48, p=0.49	
		TS RO4938581 TS RO4938581-VEH *vs.* TS VEH			**$F_{(2,38)}$= 5.24, p=0.010**	
		CO RO4938581 C0 RO4938581-VEH *vs.* CO VEH			$F_{(2,44)}$= 0.27, p=0.76	

Tabla 8 (Continuación)

Tigmotaxis (S1-S12)	MANOVA MR 'cariotipo x tratamiento'		**$F_{(11,83)}$= 23.72 P<0.001**	**$F_{(1,83)}$= 11.99 P<0.001**	$F_{(2,83)}$= 0.68 P=0.50	$F_{(2,83)}$= 2.59 P=0.81
	Comparaciones *post hoc* entre curvas de aprendizaje	TS VEH *vs.* CO VEH				**$F_{(2,22)}$= 7.28 p=0.013**
		TS RO4938581-VEH *vs.* C0 VEH			**$F_{(1,24)}$= 4.33 P=0.048**	
		TS RO4938581 *vs.* CO VEH			$F_{(1,28)}$= 0.82 P=0.37	
		TS RO4938581 *vs.* TS VEH			**$F_{(1,25)}$= 5.56 P=0.026**	
		TS RO4938581-VEH *vs.* TS VEH			$F_{(1,23)}$= 1.02, p=0.32	
		TS RO4938581 *vs.* TS RO4938581-VEH			$F_{(1,28)}$= 2.23, p=0.14	
		CO RO4938581 *vs.* C0 VEH			$F_{(1,32)}$= 0.28, p=0.59	
		CO 4938581-VEH *vs.* C0 VEH			$F_{(1,23)}$= 0.058, p=0.81	
		TS RO4938581 TS RO4938581-VEH *vs.* TS VEH			**$F_{(2,38)}$= 3.12, p=0.05**	
		C0 RO4938581 CO RO4938581-VEH *vs.* CO VEH			$F_{(2,40)}$= 0.55, p=0.43	

Tabla 8 (Continuación)

Ensayo de retirada de la plataforma	N° de cruces sobre la plataforma MANOVA 'cariotipo x tratamiento'			$F_{(1,83)}$= 2.76 P=0.10	$F_{(2,83)}$= 1.24 P=0.19	$F_{(2,83)}$= 1.33 P=0.26
	N° de entradas al cuadrante entrenado MANOVA 'cariotipo x tratamiento'			$F_{(1,83)}$= 2.88 P=0.09	$F_{(2,83)}$= 1.30 P=0.29	$F_{(2,83)}$= 2.26 P=0.11
	Tiempo en el cuadrante entrenado MANOVA 'cariotipo x tratamiento'			$F_{(1,83)}$= 3.72 P=0.058	$F_{(2,83)}$= 3.161 P=0.48	$F_{(2,83)}$= 2.44 P=0.94
Sesiones de aprendizaje guiado	MANOVA 'cariotipo x tratamiento'			**$F_{(1,83)}$= 6.10 P=0.016**	$F_{(2,83)}$= 2.29 P=0.10	$F_{(2,83)}$= 1.28 P=0.28

1.1.2. Ansiedad y actividad general

Para evaluar el papel que ejercen las distintas pautas de administración de RO4938581 sobre la ansiedad y la actividad general de los ratones TS se realizaron las pruebas del campo abierto y del laberinto elevado en cruz. De esta manera, se valoró el comportamiento de los diferentes grupos experimentales en estas pruebas donde existe un conflicto entre la aversión natural de los roedores a los espacios abiertos y/o a las alturas y su tendencia innata a explorar ambientes nuevos.

1.1.2.1. Campo abierto

En la prueba del campo abierto, los animales TS tratados con vehículo tendieron a recorrer una distancia mayor en la periferia y en el centro del aparato y, por tanto, una distancia total mayor, aunque esta diferencia no alcanzó la significación estadística (**figura 23A, tabla 9**). Esta misma tendencia a la hiperactividad se observó también cuando se cuantificaron el número de entradas en el centro y periferia del aparato, tendencia que tampoco alcanzó la significación estadística (**figura 23B, tabla 9**). El

análisis estadístico mostró que los tratamientos con RO4938581 no ejercieron ningún efecto sobre la actividad de los animales (**tabla 9**). Sin embargo, los grupos de animales TS tratados con el fármaco presentaron una actividad ligeramente menor que los TS tratados con vehículo (**figuras 23A** y **23B**). En cuanto al número de alzamientos (conducta ansiosa característica que constituye un intento de escape del aparato) o el tiempo en la periferia del aparato, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los animales de los distintos genotipos o tratamientos (**figura 23C**, **tabla 9**). Por lo tanto, la administración de RO4938581 durante 12 ó 4 semanas no modificó la actividad general o la ansiedad de los ratones TS o CO en esta prueba.

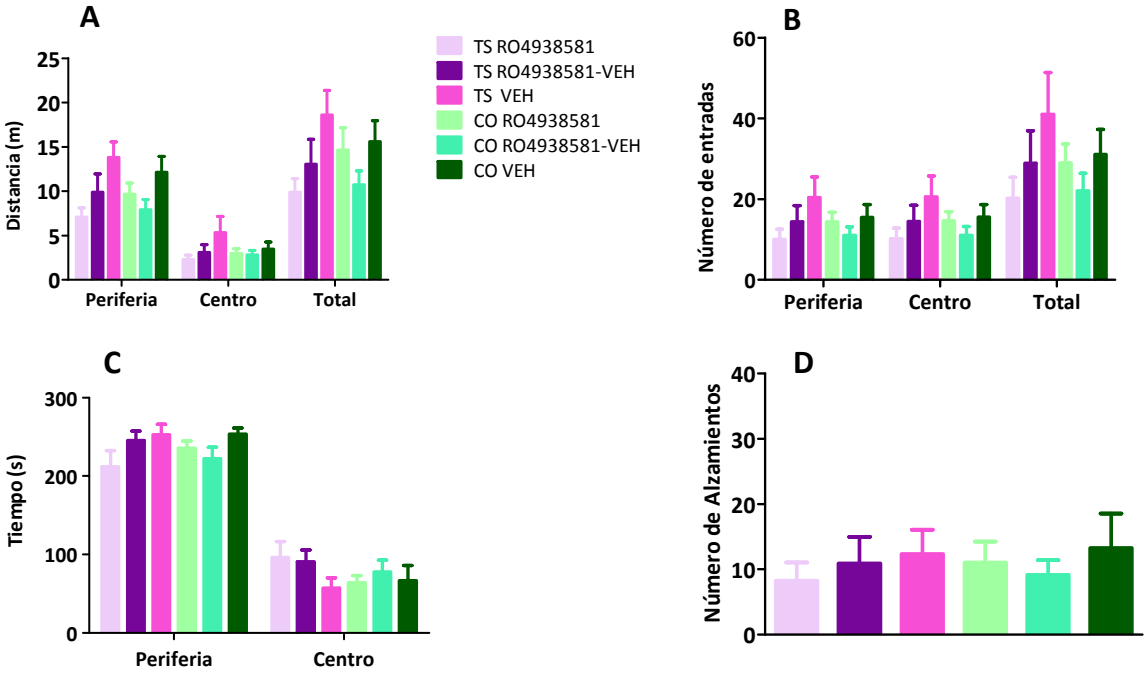

Figura 23. Los tratamientos con RO4938581 no modificaron los niveles de actividad general o la ansiedad de los ratones TS o CO en el campo abierto. Medias ± E.E.M. de la distancia recorrida (A), del número de entradas en las dos zonas del aparato (B), del tiempo en la periferia y en el centro (C) y del número de alzamientos (D) realizado por los animales TS y los CO tratados con VEH o con RO4938581 durante 12 ó 4 semanas.

Tabla 9. Valores F y p del MANOVA ('cariotipo x tratamiento') de cada variable analizada en el Campo abierto

	MANOVAs 'Cariotipo x tratamiento'		
	'Cariotipo' $F_{(1,83)}$	**'Tratamiento'** $F_{(2,83)}$	**'Cariotipo x tratamiento'** $F_{(2,83)}$
Distancia centro	1.40, p=0.23	1.17, p=0.31	2.73 ,p=0.071
Distancia periferia	0.97, p=0.32	1.90, p=0.15	2.73 ,p=0.071
Distancia total	0.61, p=0.43	0.98, p=0.37	2.93 ,p=0.059
Alzamientos	0.11, p=0.73	0.20, p=0.81	0.28, p=0.75
N° de entradas en la periferia	0.76, p=0.38	0.64, p=0.52	1.90, p=0.15
N° de entradas en el centro	0.76, p=0.38	0.64, p=0.52	1.88, p=0.15
N° de entradas totales	0.75, p=0.38	0.64, p=0.52	1.89, p=0.15
Tiempo en la periferia	0.05, p=0.81	1.13, p=0.32	1.36, p=0.26
Tiempo en el centro	0.29, p=0.58	0.55, p=0.57	0.82, p=0.44

1.1.2.2. Laberinto elevado en cruz

En la prueba del laberinto elevado en cruz se valoró nuevamente la actividad y los niveles de ansiedad de los distintos grupos experimentales al ser expuestos a un ambiente nuevo con dos zonas diferenciadas, una potencialmente aversiva (los brazos abiertos) y otra segura (los brazos cerrados). La **tabla 10** muestra los resultados del análisis estadístico efectuado para los diversos parámetros evaluados en esta prueba.

En la **figura 24A** se observa que los ratones TS se mostraron hiperactivos respecto a los del grupo CO, ya que realizaron un mayor número de entradas en los brazos abiertos del laberinto (p=0.05, **tabla 10**). Ninguna de las dos pautas de administración de RO4938581 tuvo efecto sobre la hiperactividad de los ratones TS (p=0.42, **tabla 10**). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en el número de entradas realizadas por los

ratones TS o CO tratados con el fármaco en los brazos cerrados (p=0.64, **tabla 10**) o en el número total de entradas (p=0.84, **tabla 10**, **figura 24A**).

Los 6 grupos de ratones no difirieron significativamente en ninguno de los componentes motores o cognitivos de la ansiedad evaluados en esta prueba (**ver tabla 10**). Así, los ratones TS y CO tratados con RO4938581 no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de tiempo que pasaron en los brazos abiertos (p=0.81, **tabla 10, figura 24C**), en el tiempo de inmovilidad inicial (p=0.87, **tabla 10**, **figura 24B**) o en el número de conductas de evaluación de riesgo (p=0.35, **figura 24D**). Por lo tanto, el tratamiento crónico con RO4938581 durante 12 ó 4 semanas no tuvo efectos sobre la ansiedad de ratones TS o CO.

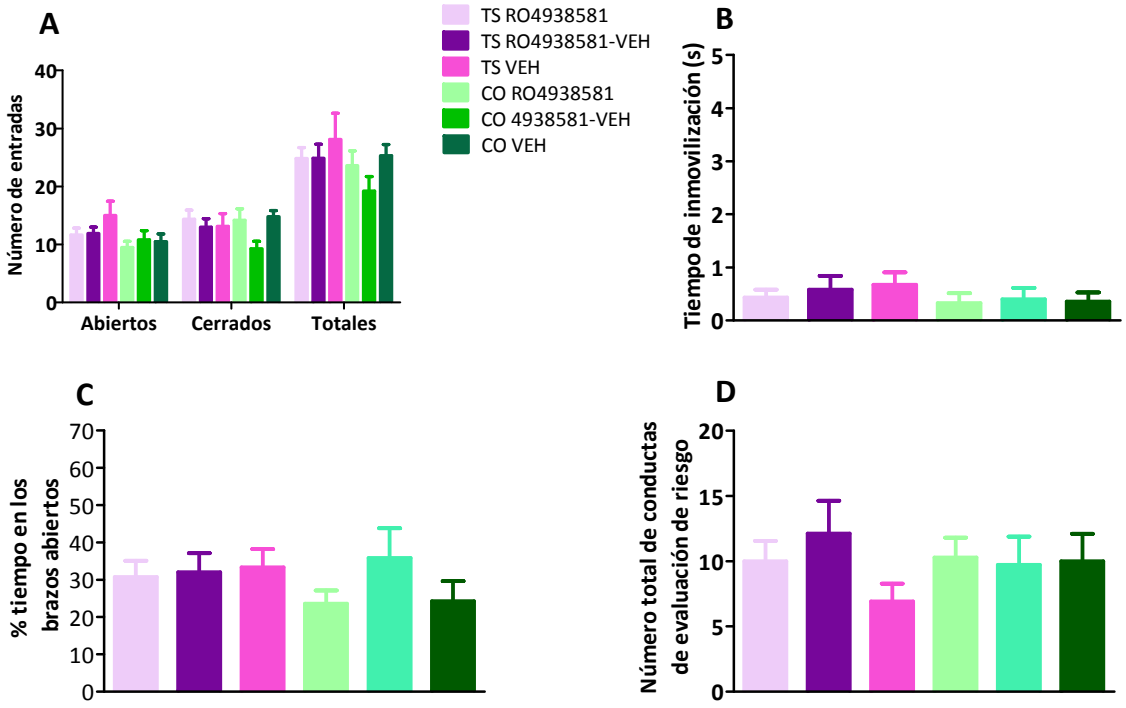

Figura 24. La administración de RO4938581 durante 4 ó 12 semanas no tuvo ningún efecto sobre la actividad ni sobre los componentes motores o cognitivos de la ansiedad evaluados en el laberinto elevado en cruz en los ratones TS o CO. Medias ± E.E.M. del número de entradas en los brazos abiertos, en los cerrados y del número total de entradas (A), del tiempo de inmovilización inicial (B), del porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (C) y del número de comportamientos de evaluación del riesgo (D) realizados por los ratones TS y CO tratados con vehículo o con RO4938581 durante 12 ó 4 semanas.

Tabla 10. Valores F y p del MANOVA ('cariotipo x tratamiento') de cada variable analizada en el laberinto elevado en cruz. Los valores estadísticamente significativos (p<0.05) se presentan en negrita

	MANOVAs 'cariotipo x tratamiento'		
	'Cariotipo' $F_{(1,83)}$	**'Tratamiento'** $F_{(2,83)}$	**'Cariotipo x tratamiento'** $F_{(2,83)}$
N° total de entradas	1.26, p=0.26	2.05, p=0.13	1.73, p=0.84
N° de entradas en los brazos abiertos	**1.69, p=0.05**	1.69, p=0.18	0.87, p=0.42
N° de entradas en los brazos cerrados	0.03, p=0.86	2.83, p=0.062	0.43, p=0.64
% de tiempo en los brazos abiertos	1.23, p=0.27	2.03, p=0.13	0.20, p=0.87
Tiempo de inmovilidad inicial	1.13, p=0.24	0.29, p=0.74	0.13, p=0.81
N° total de conductas de evaluación de riesgo	0.12, p=0.72	0.92, p=0.40	1.04, p=0.35

1.1.3. Capacidad de atención y actividad exploratoria (Tabla de agujeros)

Para valorar la capacidad de atención y la conducta exploratoria de los animales se utilizó la prueba de la tabla de agujeros. La **tabla 11** muestra los resultados del análisis estadístico de las variables evaluadas en esta prueba.

No se encontraron diferencias significativas entre los 6 grupos de animales en la distancia recorrida, en el número de exploraciones de los agujeros o en el tiempo que pasaron explorándolos (**tabla 11**).

Los animales TS y CO bajo los distintos tratamientos tampoco difirieron en el número de repeticiones de la exploración de agujeros recientemente explorados (índice ABA), lo que demuestra que ningún grupo tiene alterada su capacidad de atención. El tratamiento crónico con RO4938581 durante 4 semanas aumentó el tiempo de exploración de animales TS y CO (p=0.017, **tabla 11**). Sin embargo, la administración de este compuesto durante 12 semanas no ejerció ningún efecto sobre el tiempo de exploración de los ratones. Este efecto podría ser debido a que la administración de

RO4938581 mejorara la capacidad de atención. Sin embargo, la falta de efectos sobre los otros parámetros relacionados con la atención (número de exploraciones e índice ABA) tras la administración de este NAM indican que este compuesto no debe de afectar a la atención de estos animales.

Tabla 11. Medias ± E.E.M. y valores F y p de los MANOVAs ('cariotipo x tratamiento') para cada variable independiente analizada en la prueba de la tabla de agujeros. Los valores estadísticamente significativos (p<0.05) se presentan en negrita

	TS			CO			MANOVAs 'Cariotipo x tratamiento'		
	RO4938581	**RO4938581-VEH**	**VEH**	**RO4938581**	**RO4938581-VEH**	**VEH**	**'Cariotipo'**	**'Tratamiento'**	**'Cariotipo x tratamiento'**
							$F_{(1,83)}$	$F_{(2,83)}$	$F_{(2,83)}$
Distancia (m)	8.45 ± 0.98	10.95 ± 1.37	9.80 ± 1.69	8.14 ± 0.69	7.90 ± 0.85	8.91 ± 1.08	0.95, p=0.33	0.13, p=0.87	0.77, p=0.46
Número de exploraciones	19.67 ± 2.02	22.83 ± 1.91	19.11 ± 3.03	21.68 ± 1.50	21.93 ± 2.19	18.36 ± 1.21	0.05, p=0.82	1.11, p=0.33	0.18, p=0.83
Tiempo explorando los agujeros (s)	19.64 ± 2.35	26.96 ± 3.14	18.57 ± 5.70	18.87 ± 2.06	31.81 ± 3.75	22.88 ± 2.52	0.74, p=0.39	**4.32, p=0.017**	0.41, p=0.66
Índice ABA	3.46 ± 0.40	4.17 ± 0.61	5.00 ± 0.72	4.48 ± 0.58	3.80 ± 0.73	3.50 ± 0.62	1.26, p=0.26	0.56, p=0.56	2.94, p=0.059

1.1.4. Habilidades sensoriales y coordinación motora

Con el fin de evaluar el efecto del fármaco RO4938581 sobre el estado físico de los animales se realizó una batería de pruebas sensorimotoras y una valoración de su función motora.

1.1.4.1. Habilidades sensoriales: Pruebas sensorimotoras

La **tabla 12** muestra las puntuaciones obtenidas en distintos parámetros y reflejos sensoriales y motores analizados en los diferentes grupos de animales así como los resultados estadísticos obtenidos en el análisis de cada una de las variables. No se encontraron diferencias significativas en las puntuaciones obtenidas por los seis grupos

experimentales en las distintas variables sensoriales y motoras. El tratamiento con RO4938581 no modificó ninguna de las habilidades sensorimotoras evaluadas en los ratones TS o CO (visión, audición, fuerza, equilibrio, reflejo prensil, capacidad de tracción o coordinación motora en la prueba de la percha).

Tabla 12. Batería de pruebas sensorimotoras. Medias ± E.E.M. de las puntuaciones obtenidas por todos los grupos experimentales en los distintos parámetros sensoriales y motores evaluados. Valores F y p del MANOVA ('cariotipo x tratamiento') de cada variable dependiente analizada. Los valores estadísticamente significativos (p<0.05) se presentan en negrita

	TS			CO			MANOVAs 'Cariotipo x tratamiento'		
	RO4038581	RO4938581-VEH	VEH	RO4038581	RO4938581-VEH	VEH	'Cariotipo' $F_{(1,83)}$	'Tratamiento' $F_{(2,83)}$	'Cariotipo x tratamiento' $F_{(2,83)}$
Respuesta de alcance (puntuación: 0-4)	2.93 ± 0.051	3.13 ± 0.12	3.18 ± 0.12	2.42 ± 0.15	2.50 ± 0.15	2.27 ± 0.20	0.002, p=0.96	2.05, p=0.13	0.82, p=0.44
Respuesta de sobresalto (puntuación: 0-3)	2.92 ± 0.77	2.93 ± 0.67	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	0.29, p=0.58	6.94, p=0.002	1.56, p=0.21
Reflejo de Enderezamiento (puntuación: 0-3)	2.96 ± 0.03	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	1.32, p=0.25	1.20, p=0.30	0.55, p=0.57
Fuerza de agarre (puntuación: 0-3)	2.74 ± 0.08	2.81 ± 0.18	2.73 ± 0.14	2.80 ± 0.17	2.88 ± 0.15	3.00 ± 0.10	0.62, p=0.43	0.25, p=0.77	0.50, p=0.60
Equilibrio en barra madera (puntuación: 0-6)	2.19 ± 0.27	1.56 ± 0.28	1.64 ± 0.24	1.90 ± 0.23	1.69 ± 0.23	2.43 ± 0.34	0.68, p=0.41	1.58, p=0.21	1.94, p=0.14
Latencia de caída de la barra de madera (s)	39.56 ± 2.30	39.56 ± 1.75	40.0 ± 0	40.00 ± 0	40.00 ± 0	40.0 ± 0	0.002, p=0.96	0.23, p=0.79	0.92, p=0.40
Equilibrio en barra aluminio (puntuación: 0-6)	1.52 ± 0.3	1.06 ± 0.42	1.00 ± 0.55	1.20 ± 0.26	2.50 ± 1.27	0.79 ± 0.31	0.50, p=0.48	0.81, p=0.44	1,61, p=0.20
Latencia de caída de la barra de aluminio (s)	23.89 ± 2.25	18.06 ± 2.98	22.0 ± 3.56	27.10 ± 2.32	22.81 ± 3.26	19.36 ± 2.65	0.56, p=0.45	2.41, p=0.95	0.18, p=0.44
Reflejo prensil (puntuación: 0-3)	2.81 ± 0.07	2.88 ± 0.12	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	2.88 ± 0.08	3.00 ± 0.00	0.69, p=0.40	0.39, p=0.67	0.76, p=0.46

Tabla 12 (continuación)

Capacidad de tracción (puntuación: 0-9)	1.88 ± 0.46	2.0 ± 0.70	1.91 ± 0.51	1.80 ± 0.37	2.00 ± 0.53	2.21 ± 0.58	0.03, p=0.86	0.10, p=0.90	0.06, p=0.93
Latencia de caída en la percha (s)	2.70 ± 0.38	2.88 ± 0.50	2.36 ± 0.41	3.20 ± 0.68	3.31 ± 0.35	3.86 ± 0.61	3.71, P=0.057	0.055, p=0.94	0.47, p=0.62
N° Cruces en la percha	13.89 ± 3.30	9.44 ± 3.37	18.1 ± 5.76	13.20 ± 2.99	24.94 ± 4.44	20.1 ± 4.99	3.55, p=0.062	1.09, p=0.36	**3.11, p=0.049**
Latencia de llegada en la percha	37.41 ± 4.40	38.81 ± 5.31	28.00 ± 6.42	36.05 ± 4.96	40.06 ± 4.94	38.7 ± 5.66	0.47, p=0.49	0.60, p=0.54	0.58, p=0.55

1.1.4.2. Coordinación motora: Rotarod

La **figura 25** muestra la latencia de caída a diferentes velocidades constantes (A) y durante el ciclo de aceleración (B) de los 6 grupos de ratones durante la prueba del Rotarod. No se encontraron diferencias significativas en la latencia de caída de los ratones TS y CO bajo los distintos tratamientos a las 3 velocidades constantes analizadas (25 r.p.m.: ANOVA 'cariotipo': $F_{(1,83)}$=0.17, p=0.67; 'tratamiento': $F_{(2,83)}$= 0.18, p=0.83; 'cariotipo x tratamiento.': $F_{(2,83)}$=0.88, p=0.25; 50 r.p.m.: 'cariotipo': $F_{(1,83)}$= 2.30, p=0.13; 'tratamiento': $F_{(2,83)}$=0.93, p=0.39; 'cariotipo x tratamiento´: $F_{(2,83)}$=2.83, p=0.064; **figura 25A**).

Asimismo, durante el ciclo de aceleración, en el que el nivel de exigencia de la prueba aumenta progresivamente, la latencia de caída fue similar en los seis grupos de animales (ANOVA 'cariotipo': $F_{(1,83)}$=0.14, p=0.70; 'tratamiento': $F_{(2,83)}$=0,20, p=0,81; 'cariotipo x tratamiento': $F_{(2,83)}$= 1.48, p=0.23; **figura 25B**).

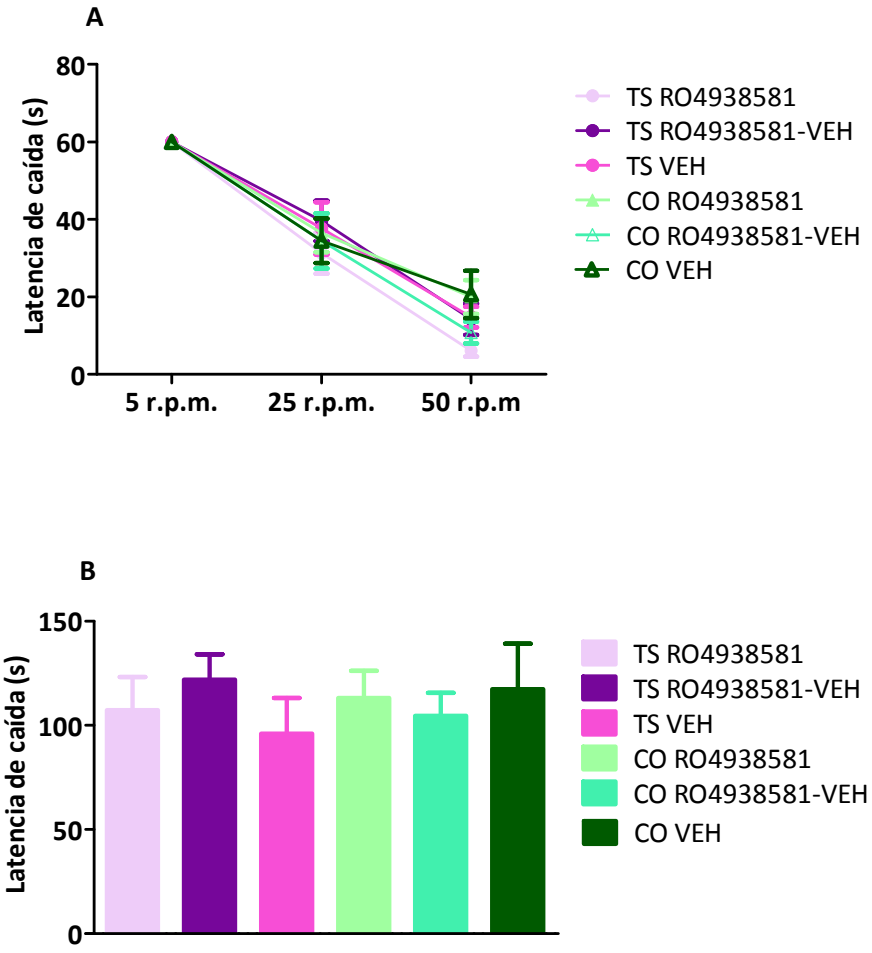

Figura 25. **El tratamiento con RO4938581 no afectó la coordinación motora de los ratones TS o CO en el Rotarod a diferentes velocidades constantes o durante el ciclo de aceleración**. Medias ± E.E.M. de la latencia de caída a distintas velocidades constantes (A) y durante el ciclo de aceleración (B) de los ratones TS y CO tratados con VEH o con RO4938581 durante 12 ó 4 semanas.

1.2. Efectos sobre los déficits neuromorfológicos del ratón TS

1.2.1. Proliferación de progenitores neurales (Ki67) en la SGZ del hipocampo

Los ratones TS mostraron una menor densidad (ANOVA 'cariotipo': $F_{(1,40)}$=11.61, p=0.002, **figura 26B**) de progenitores neurales (células Ki67$^+$) en la SGZ del DG que los ratones CO.

El tratamiento crónico con RO4938581, tanto durante 12 como durante 4 semanas, restauró por completo la densidad de células Ki67$^+$ en los ratones TS (ANOVA 'tratamiento': $F_{(2,40)}$=3.11, p=0.050, **figuras 26A y 26B**), pero no tuvo efecto en los ratones CO (ANOVA 'cariotipo x tratamiento': $F_{(2,40)}$=4.07, p=0.025). Por lo tanto, esta

recuperación de la proliferación celular del hipocampo de los animales TS se mantuvo tras cesar el tratamiento durante 8 semanas.

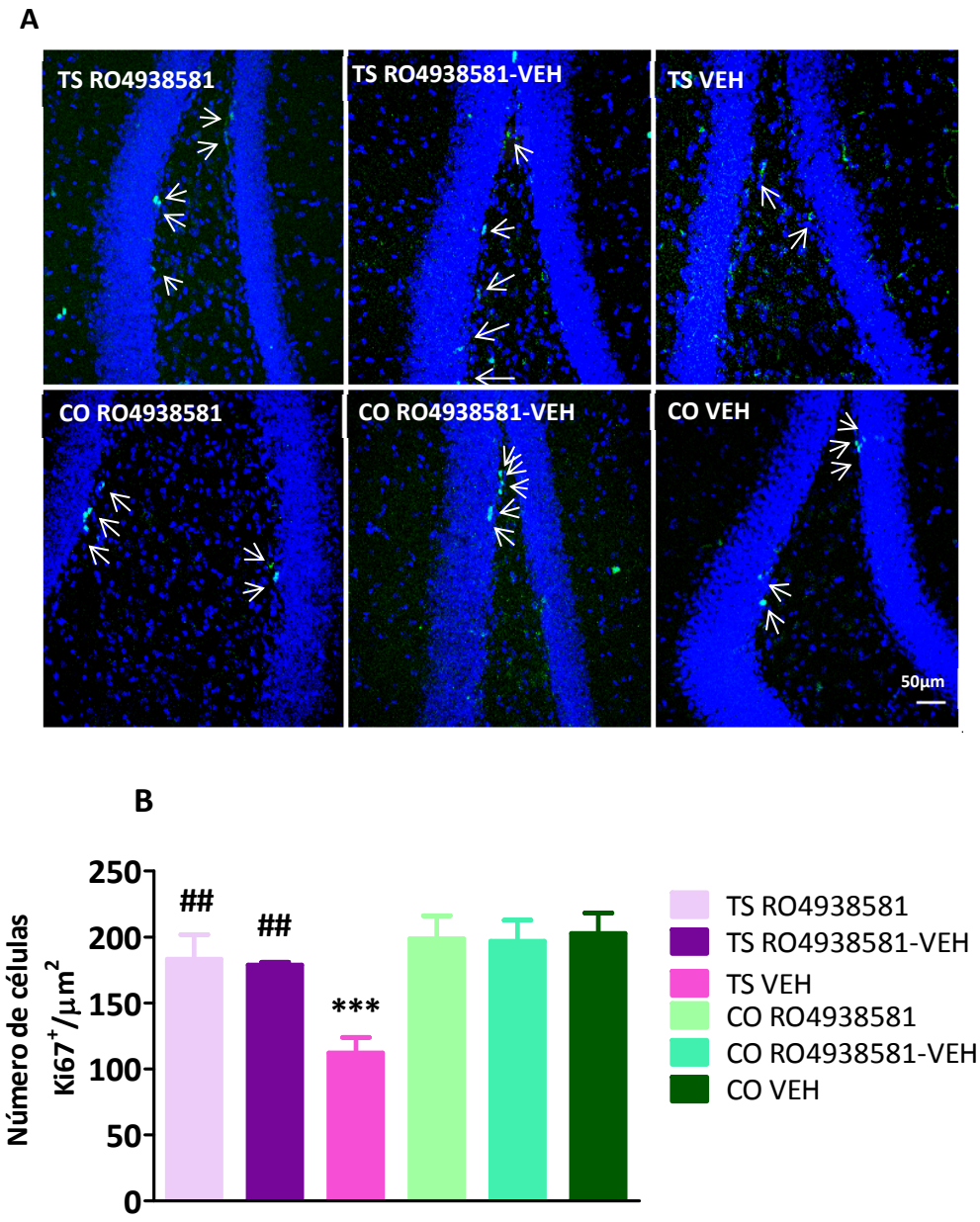

Figura 26. El tratamiento con RO4938581 recuperó la densidad de células proliferativas en el DG de los ratones TS. Imágenes representativas de la co-inmunotinción con DAPI (marcador de núcleos celulares) y Ki67 (marcador de células proliferativas) en el DG del hipocampo. Las flechas indican las células Ki67 positivas. La barra de escala corresponde a 50 µm (A). Medias ± E.E.M. de la densidad (B) de las células $Ki67^+$ en los 6 grupos de animales. ***: p<0.001 TS *vs*. CO; ##: p<0.01 VEH *vs.* RO4938581 o *vs*. RO4938581-VEH; Pruebas de Bonferroni tras ANOVAs significativos.

1.2.2. Diferenciación celular en la SGZ del hipocampo (DCX y CLR)

Para evaluar los efectos de las dos pautas de tratamiento con RO4938581 sobre la densidad de neuroblastos en diferentes estadíos de diferenciación hacia neuronas maduras se usaron los marcadores DCX y CLR.

Los ratones TS mostraron un deterioro en la diferenciación y maduración celular del hipocampo ya que presentaron una densidad menor de las subpoblaciones DCX^+/CLR^-, DCX^+/CLR^+ y DCX^-/CLR^+ en comparación con los animales CO (**figuras 27 y 28A-C**, **tabla 13**).

El tratamiento con RO4938581 durante 12 ó 4 semanas produjo un aumento significativo de la densidad de las poblaciones DCX^+/CLR^- y DCX^+/CLR^+. Sin embargo, la administración de RO4938581 no modificó significativamente la densidad de la población de células DCX^-/CLR^+ (**figura 28C**, **tabla 13**). Ninguna de las dos pautas de administración del fármaco tuvo efectos en los ratones CO (**figuras 28A-C, tabla 13**).

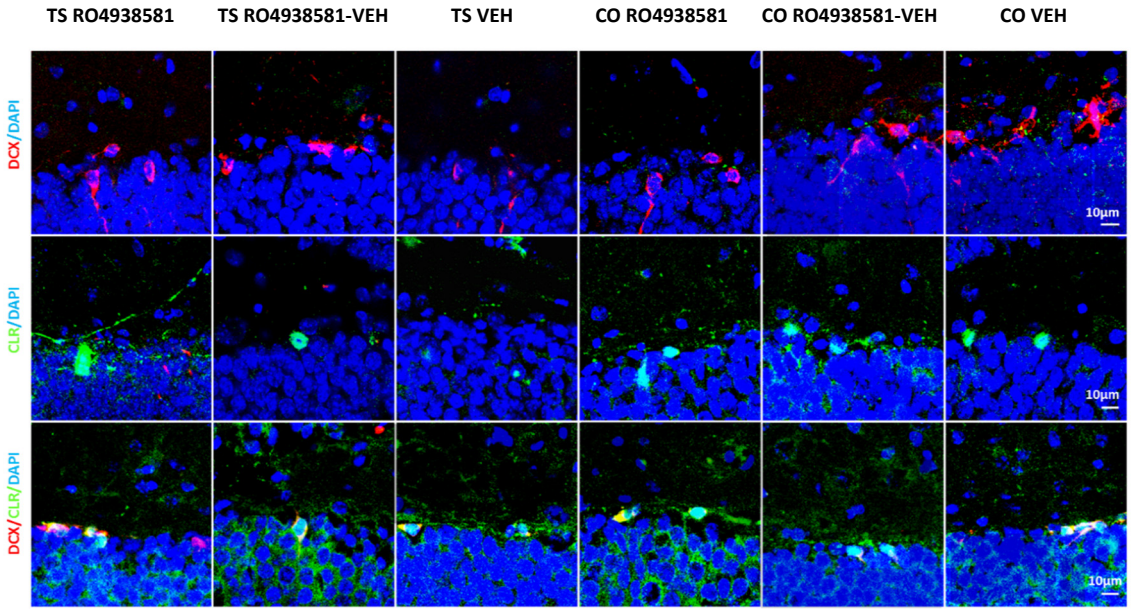

Figura 27. Imágenes representativas de las poblaciones celulares identificadas mediante la co-inmunotinción de DCX (fila superior), de CLR (fila intermedia) o de ambas proteínas (fila inferior) y DAPI. La barra de escala corresponde a 10 µm.

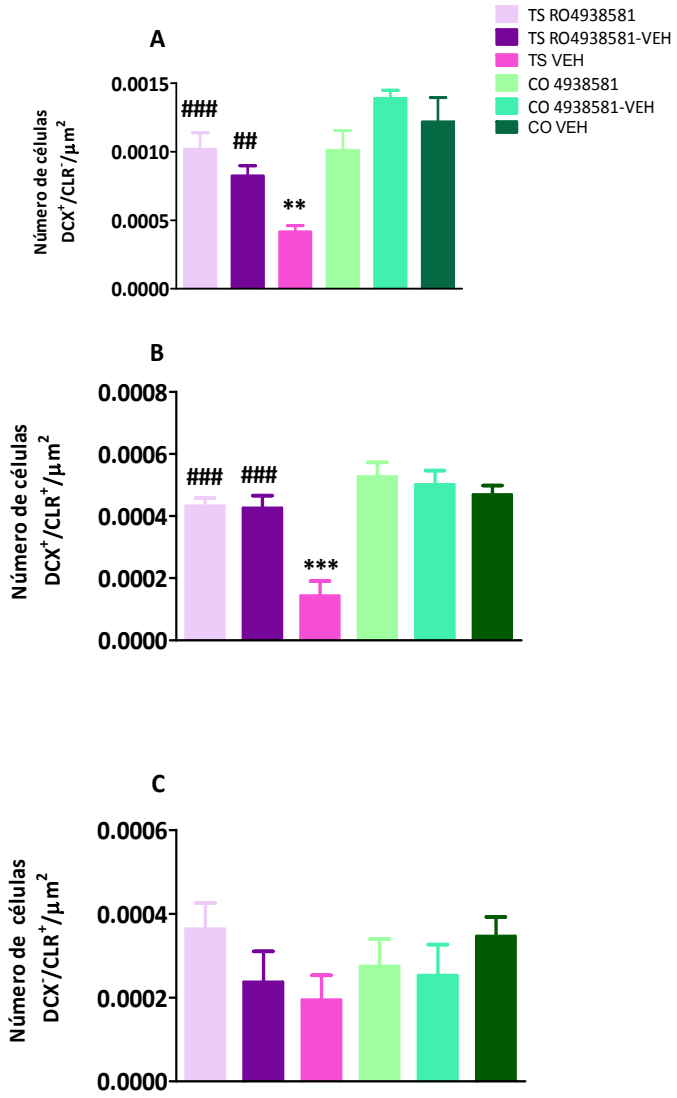

Figura 28. El tratamiento con RO4938581 recuperó la densidad de células DCX$^+$/CLR$^-$ y DCX$^+$/CLR$^+$ pero no tuvo efectos significativos sobre la población de células DCX$^-$/CLR$^+$. Medias ± E.E.M de la densidad de células DCX$^+$/ CLR$^-$, DCX$^+$/CLR$^+$ y DCX$^-$/CLR$^+$ encontradas en la SGZ del hipocampo de los 6 grupos de animales. **: p<0,01, ***: p<0.001 TS *vs*. CO; ##: p<0.01, ###: p<0.001 VEH *vs.* RO4938581 o *vs*. RO4938581-VEH. Pruebas de Bonferroni tras ANOVAs significativos.

Tabla 13. Valores F y p del MANOVA ('cariotipo x tratamiento') de la densidad de células DCX^+/CLR^-, DCX^+/CLR^+ Y DCX^-/CLR^+ en la SGZ. Los valores estadísticamente significativos (p<0.05) se presentan en negrita

	MANOVAs 'cariotipo x tratamiento'		
	'Cariotipo' $F_{(1,40)}$	**'Tratamiento'** $F_{(2,40)}$	**'Cariotipo x tratamiento'** $F_{(2,40)}$
Densidad $DCX^+/CLR^-/\mu m^2$	**21.89, p<0.001**	3.04, p=0.061	**6.59, p=0.004**
Densidad $DCX^+/CLR^+/\mu m^2$	**26.3, p<0.001**	**12.21, p<0.001**	**6.34, p=0.004**
Densidad $DCX^-/CLR^+/\mu m^2$	0.26 ,p=0.61	0.70, p=0.50	1.91, p=0.16

1.2.3. Densidad de células granulares maduras ($DAPI^+$) en el hipocampo

Para valorar los efectos de las dos pautas de administración de RO4938581 sobre el número y la densidad de las células maduras del DG, se efectuó un recuento nuclear total utilizando el marcador DAPI, sin discernir tipos celulares, dado que la composición fundamental del DG es la neurona granular madura.

En este estudio se confirma la reducción en la densidad de células granulares en el GCL de los animales TS (ANOVA 'cariotipo': $F_{(1,40)}$=31.0, p<0.001, **figuras 29A y 29B**). El tratamiento con RO4938581 durante 12 ó 4 semanas seguidas de 8 de vehículo, normalizó por completo la densidad de células $DAPI^+$ en los animales TS (ANOVA 'tratamiento': $F_{(2,40)}$=9.77, p<0.001). Sin embargo, ninguna de las dos pautas de tratamiento tuvo efecto sobre el grupo de animales CO (ANOVA 'cariotipo x tratamiento': $F_{(2,40)}$=13.71, p<0.001).

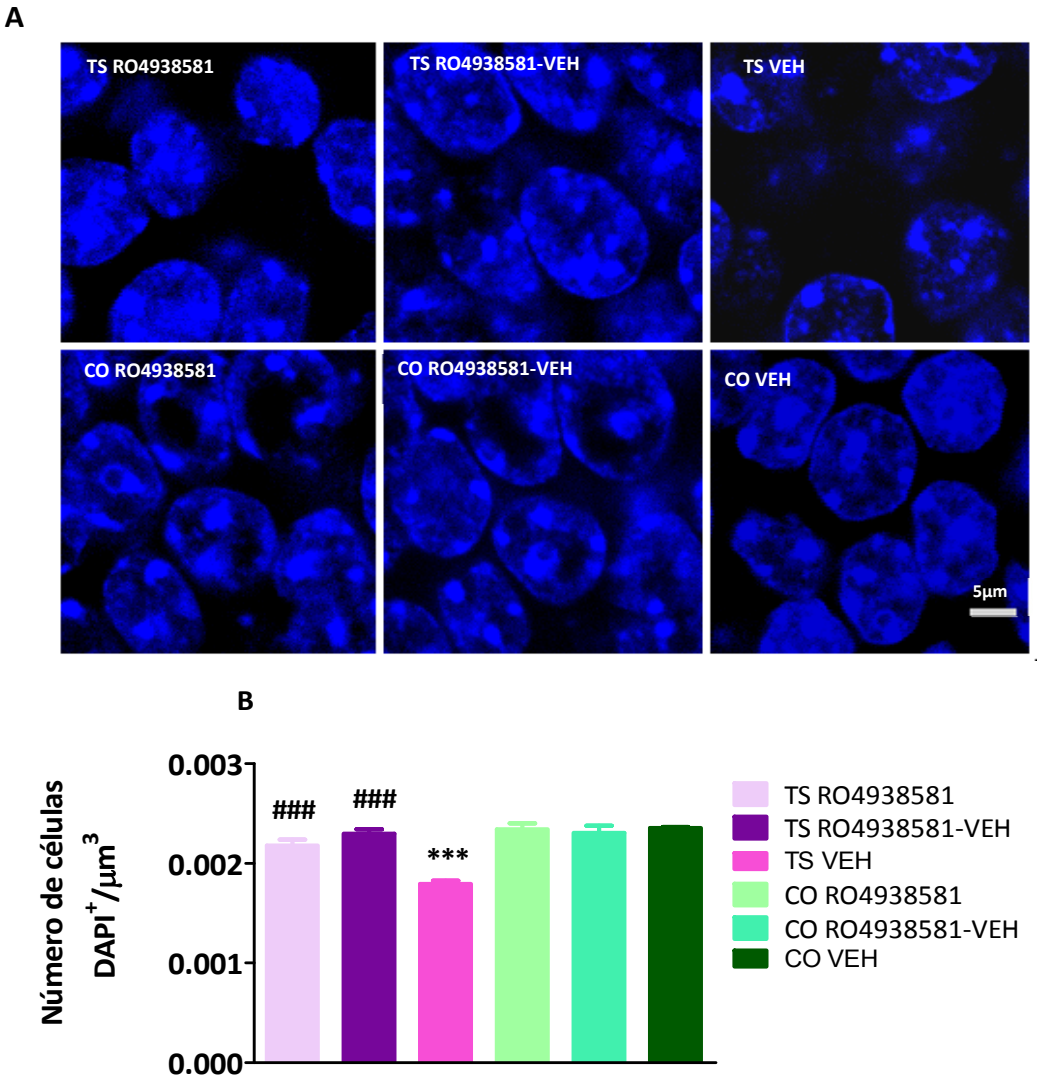

Figura 29. El tratamiento con RO4938581 normalizó la densidad de células granulares del hipocampo de los ratones TS. Imágenes representativas de la inmunotinción con DAPI en el DG hipocampal. La barra de escala corresponde a 5 µm (A). Medias ± E.E.M de la densidad (B) de células $DAPI^+$ en el DG de los 6 grupos de animales. ***: p<0.001 TS *vs*. CO; ###: p<0,001 VEH *vs*. RO4938581 o *vs*. RO4938581-VEH. Pruebas de Bonferroni tras ANOVAs significativos.

1.2.4. Balance sináptico excitador (VGluT1) – inhibidor (VGAT) en el hipocampo

Para evaluar los efectos de las dos pautas de administración de RO4938581 sobre el desequilibrio entre sinapsis excitadoras e inhibidoras existente en el cerebro del ratón TS, se realizó una doble inmunohistoquímica en la que se usaron dos marcadores: VGluT1 para medir el área ocupada por botones sinápticos excitadores y VGAT para

cuantificar la densidad botones sinápticos inhibidores, en la ML del DG del hipocampo (**figura 30A**).

El MANOVA no reveló un efecto significativo del cariotipo sobre el área ocupada por sinapsis inhibidoras, excitadoras o en el ratio de ambos marcadores (**tabla 14**). Este hecho se debe principalmente a que en los animales TS tratados se produjo una normalización de la densidad de ambos tipos de botones sinápticos ya que, las pruebas *post hoc* mostraron que los ratones TS tratados con vehículo presentaron un mayor porcentaje de área ocupada por botones VGAT positivos ($p<0.01$, **figura 30B**) y un menor porcentaje de área ocupada por botones VGluT1 positivos ($p<0.01$, **figura 30C**) que los ratones CO. Además, el ratio VGluT1/VGAT (**figura 30D**) también fue menor en los ratones TS con respecto a los animales control ($p<0.001$). Estos resultados confirman que el ratón TS tiene un exceso de inhibición cerebral.

El tratamiento crónico con RO4938581 rescató por completo la densidad de botones VGAT en ratones TS e indujo una reducción de estos botones en los animales CO (**figuras 30A y 30B**, **tabla 14**, $p<0.001$). Este efecto fue más acusado en los ratones TS y CO tratados durante 12 semanas que en los tratados solo durante 4 semanas. Además, ambas pautas de administración de este NAM normalizaron por completo el área ocupada por botones glutamatérgicos (VGluT1) en el ratón TS (**figuras 30A y 30C**, **tabla 14**, $p<0.001$) pero no tuvo ningún efecto en los animales CO.

Finalmente, cuando se analizó el balance excitador/inhibidor dividendo el área ocupada por botones $VGluT1^+$ entre el área ocupada por botones $VGAT^+$, se observó que el tratamiento crónico con RO4938581 durante 4 ó 12 semanas rescató completamente la sobre-inhibición de los animales TS (**tabla 14**, **figura 30D**, $p<0.001$). Sin embargo, ninguna de las dos pautas de tratamiento afectó al balance excitador/inhibidor de los animales CO.

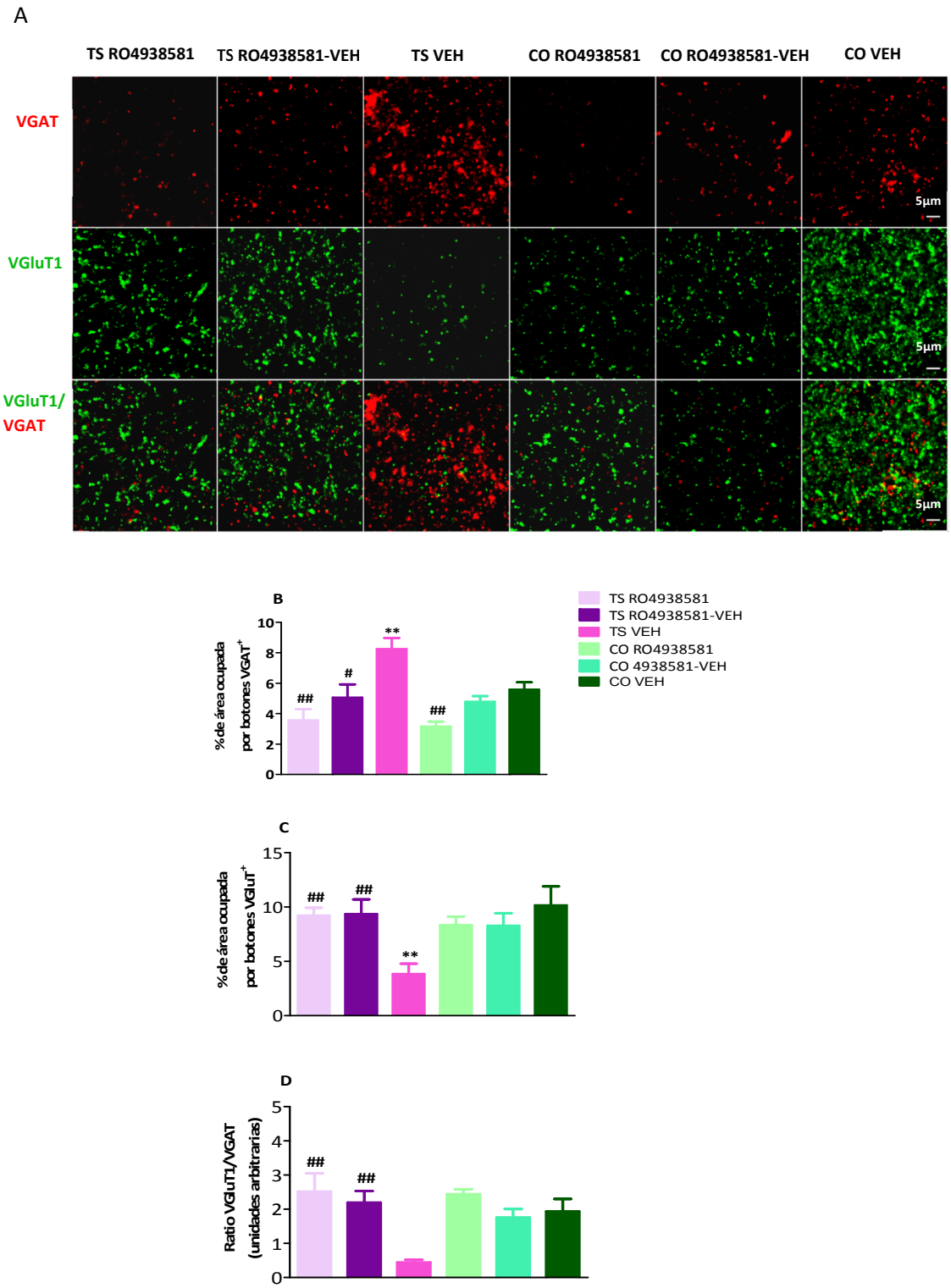

Figura 30. El tratamiento con RO4938581 normalizó la densidad de marcadores de sinapsis GABAérgicas en el hipocampo de los ratones TS. Imágenes representativas de la inmunotinción con VGAT y con VGluT1 (A). Medias ± E.E.M. del porcentaje de área ocupada por botones $VGAT^+$ (A), $VGluT1^+$ (B) y la relación entre ambos (ratio VGluT1/VGAT) (C) en la ML del hipocampo de los 6 grupos de animales. **: p<0.01; TS vs. CO, #: p <0.05, ##: p<0.01 VEH *vs*. RO4938581 o *vs*. RO4938581-VEH. Pruebas de Bonferroni tras ANOVAs significativos.

Tabla 14. Valores F y p del MANOVA ('cariotipo x tratamiento') del área ocupada por los botones VGAT, VGluT1 y de la relación entre ambos (ratio VGluT1/VGAT) en la ML del DG. Los valores estadísticamente significativos (p<0.05) se presentan en negrita

	MANOVAs 'cariotipo x tratamiento'		
	'Cariotipo' $F_{(1,40)}$	**'Tratamiento'** $F_{(2,40)}$	**'Cariotipo x tratamiento'** $F_{(2,40)}$
% de área ocupada por botones VGAT$^+$	2.35, p=0.10	**15.8, p<0.001**	2.38, p=0.10
% de área ocupada por botones VGluT1$^+$	1.11, p=0.28	1.78, p=0.18	**8.47, p=0.001**
Ratio VGluT1/VGAT	1.94, p=0.17	**10.04, p<0.001**	**6.49, p=0.004**

2. Estudio 2. Efecto de la administración prenatal de ácido linolénico, ácido oleico y curcumina sobre la neurogénesis hipocampal del ratón TS

El ratón TS presenta déficits neuromorfológicos desde etapas embrionarias, por ello, en este segundo Estudio, el objetivo fue evaluar si la administración prenatal de ácido linolénico, ácido oleico y curcumina rescata las alteraciones en la neurogénesis hipocampal que muestran los ratones TS desde el momento del nacimiento.

2.1. Análisis de los niveles plasmáticos de ácido linolénico, ácido oleico y curcumina

Para comprobar que los compuestos atravesaban la barrera placentaria y que existían niveles óptimos de estos compuestos en la sangre de las crías, se recogieron muestras en las crías el día postnatal 2 (P2) y se procedió a la determinación de estos compuestos por HPLC.

La **tabla 15** muestra la concentración de estos compuestos en el plasma de las crías en P2. Los resultados se expresan en µg/ml en el caso de los ácidos y en ng/ml en el caso de la curcumina. Dado que el ácido linolénico y el ácido oleico son necesarios para la síntesis de varias moléculas, se encuentran presentes de forma endógena en el organismo, sin embargo, en el caso de la curcumina no se detectaron niveles basales en las crías.

Tabla 15. Niveles plasmáticos basales y después de la administración de ácido linolénico, ácido oleico y curcumina en crías

	Ácido linolénico (µg/ml)	Ácido oleico (µg/ml)	Curcumina (ng/ml)
Valores basales	2.7	9.3	-
Valores en ratones tratados	8.6	20.4	No determinado

Las crías presentaron mayores niveles plasmáticos de ácido oleico y ácido linolénico tras su administración exógena en relación a sus niveles basales. Sin embargo, no se detectó curcumina en las crías tratadas probablemente debido a que esta sustancia tiene una

vida media muy corta. Por otro lado, la técnica utilizada tiene una sensibilidad de detección de curcumina en un rango entre 10 y 100 ng/ml, por lo que es posible que en las crías la concentración de esta sustancia estuviera por debajo de dicho umbral y por ello no se detectaran niveles de curcumina en su plasma.

2.2. Efecto sobre la viabilidad en el parto y la natalidad

En este estudio se evaluó si la administración de los diferentes compuestos afectaba a la viabilidad en el parto y a la natalidad.

En la **figura 31A** se representa el porcentaje de abortos espontáneos tras el tratamiento con los tres compuestos. Los resultados muestran que alrededor de un 15 % de las hembras TS tratadas con BSA terminan sufriendo abortos espontáneos durante la gestación. El porcentaje de abortos no se vio afectado por la administración de **ácido linolénico** (χ^2(1g.l.)=0.397, p=0.528) ni de **ácido oleico** (χ^2(1g.l.)=3.405, p=0.065). Sin embargo, la proporción de abortos disminuyó tras la administración de curcumina (χ^2(1g.l.)=4.50, p=0.033).

De todas las hembras preñadas que fueron tratadas con BSA, el 54 % llevó a término la gestación (**figura 31B**). La administración de **ácido linolénico** (χ^2(1g.l.)=0.020, p=0.887), **ácido oleico** (χ^2(1g.l.)=0.020, p=0.887) o **curcumina** (χ^2(1g.l.)=1.280, p=0.26) (**figura 31B**) no modificó el número de hembras que llegaron a parir.

Por otro lado, se analizó el porcentaje de crías muertas al nacer en cada tratamiento (**figura 31C**). Las hembras que recibieron BSA tuvieron un 3 % de crías muertas al nacer, una proporción bastante pequeña, que no se vio modificada por el tratamiento con **ácido linolénico** (χ^2(1g.l.)=0.94, p=0.33) o curcumina (χ^2(1g.l.)=2.21, p=0.14). Tras la administración de **ácido oleico** no se encontró ninguna cría muerta.

Por último, se analizó el porcentaje de crías rechazadas por sus madres tras el tratamiento (**figura 31D**). En las crías tratadas con BSA el porcentaje de rechazos fue del 23 %. Este porcentaje se incrementó de manera significativa tras el tratamiento con **ácido oleico** (χ^2(1g.l.)=26.69, p<0.001) y **ácido linolénico** (χ^2(1g.l.)=9.826, p<0.001) y no se vio afectado por la administración de curcumina (χ^2(1g.l.)=1.147, p =0.284).

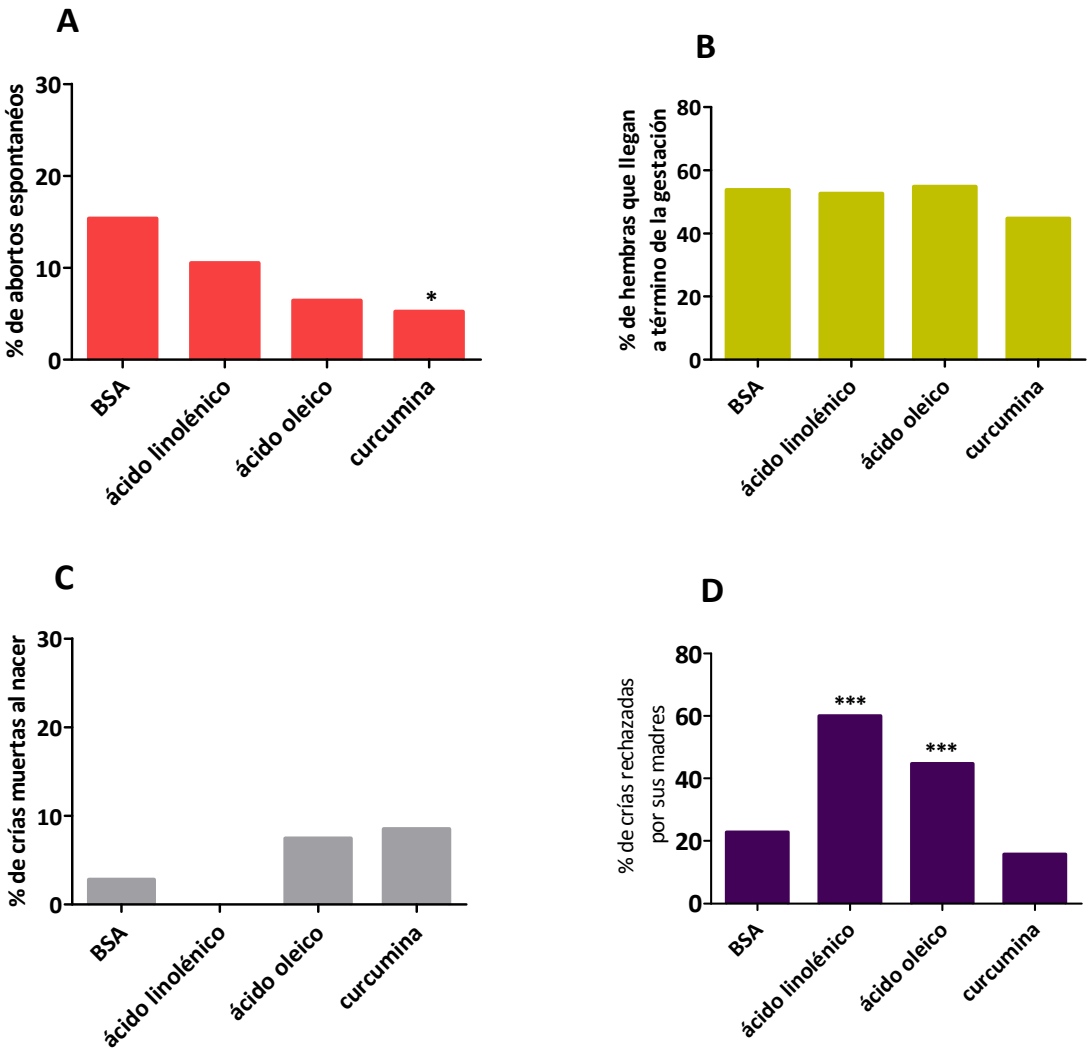

Figura 31. Efectos del tratamiento con BSA, ácido linolénico, ácido oleico o curcumina sobre el porcentaje de abortos espontáneos (A), de hembras que llegan a término su periodo de gestación (B), de crías muertas al nacer (C) y de crías rechazadas por sus madres en los dos primeros días de vida (D). *: $p<0.05$, ***: $p<0.001$ tratamiento *vs*. BSA. Pruebas χ^2.

2.3. Efecto sobre el peso corporal y cerebral

Los ratones trisómicos presentan una disminución del peso corporal y cerebral que es evidente desde las primeras etapas del desarrollo, por ello, se evaluó el efecto de la administración de los distintos compuestos sobre estos parámetros.

En lo que se refiere al peso corporal de los animales, como se observa en la **figura 32A**, los ratones TS presentaron un peso corporal menor que los animales CO (ANOVA 'cariotipo': $F_{(1,117)}=17.72$, $p<0.001$, **figura 32A**).

Cuando se avaluó el efecto de los tres tratamientos sobre el peso corporal no se encontraron diferencias significativas (ANOVA 'tratamiento': $F_{(3,117)}$=0.74, p=0.53; 'cariotipo x tratamiento' $F_{(3,117)}$=1.28, p=0.28; **figura 32A**, **tabla 16**). Sin embargo, cuando se analizó el efecto de cada compuesto por separado, se observó que el tratamiento con ácido oleico (**figura 32A, tabla 16**) recuperó el peso corporal de los ratones TS. De hecho, no se encontraron diferencias entre el peso corporal de los ratones TS tratados con ácido oleico y los CO que recibieron BSA (p=0.072). Sin embargo, el peso corporal no aumentó tras el tratamiento con ácido linolénico o curcumina (**figura 32A, tabla 16**).

En cuanto al peso del cerebro, los animales TS tratados con BSA presentaron un menor peso que los CO (ANOVA 'cariotipo': $F_{(1,117)}$=10.26, p=0.002, **figura 32B**). Al analizar el efecto de los tres tratamientos a la vez, se observó que estos compuestos aumentaron significativamente el peso cerebral de los animales ratones TS (ANOVA 'tratamiento': $F_{(3,117)}$=2.80, p=0.043; 'cariotipo x tratamiento': $F_{(3,117)=}$1.40, p=0.24, **figura 32B**). Sin embargo, al evaluar el efecto de cada tratamiento por separado, se observó que este efecto fue debido al incremento del peso cerebral encontrado en el cerebro de las crías que habían recibido ácido oleico en la etapa prenatal (**figura 32B, tabla 16**, p=0.19), ya que la de ácido linolénico (**figura 32B, tabla 16**) o curcumina (**figura 32B, tabla 16**) no modificó el peso cerebral de los animales.

Por tanto, el ácido oleico fue el tratamiento que produjo más beneficios sobre el peso corporal y cerebral de los animales TS. Por último, ninguno de los tratamientos tuvo efectos sobre estos dos parámetros en los ratones CO.

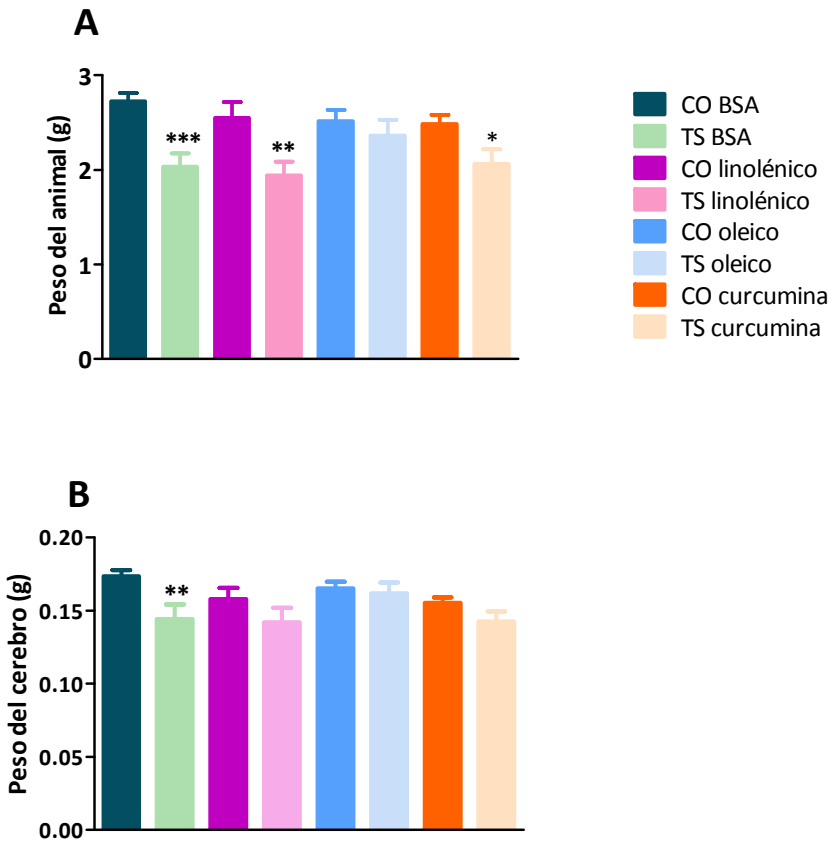

Figura 32. El tratamiento con ácido oleico normalizó el peso corporal y cerebral de las crías TS. Medias ± E.E.M. del peso corporal (A) y cerebral (B) de las crías nacidas de madres tratadas con ácido linolénico, ácido oleico, curcumina o BSA. *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001 TS *vs*. CO. Pruebas de Bonferroni tras ANOVAs significativos.

Tabla 16. Valores F y p del MANOVA ('cariotipo x tratamiento') del peso corporal y del peso cerebral de los animales tratados con BSA, ácido linolénico, ácido oleico o curcumina. Los valores estadísticamente significativos (p<0.05) se presentan en negrita

	MANOVAs 'cariotipo x tratamiento'		
Ácido linolénico	**'Cariotipo'** $F_{(1,55)}$	**'Tratamiento'** $F_{(3,55)}$	**'Cariotipo x tratamiento'** $F_{(1,55)}$
Peso del animal (g)	**20.64, p<0.001**	10.89, p=0.350	0.92, p=0.763
Peso del cerebro (g)	**8.95, p=0.005**	1.41, p=0.242	0.785, p=0.382

Tabla 16 (Continuación)

Ácido oleico	**'Cariotipo'** $F_{(1,72)}$	**'Tratamiento'** $F_{(3,72)}$	**'Cariotipo x tratamiento'** $F_{(1,72)}$
Peso del animal (g)	**9.45, p=0.003**	0.18, p=0.672	3.89, p=0.06
Peso del cerebro (g)	**6.85, p=0.012**	0.55, p=0.458	**4.41, p=0.041**
Curcumina	**'Cariotipo'** $F_{(1,42)}$	**'Tratamiento'** $F_{(3,42)}$	**'Cariotipo x tratamiento'** $F_{(1,42)}$
Peso del animal (g)	**15.61, p<0,001**	0.55, p=0,460	0.958, p=0.331
Peso del cerebro (g)	**12.15, p<0.001**	2.73, p=0.10	1.83, p=0.18

2.4. Efectos sobre la neurogénesis hipocampal del ratón TS

2.4.1. Influencia del tratamiento sobre la anatomía hipocampal, tinción de Nissl

Dado que el hipocampo es una de las estructuras más afectadas en los ratones TS, a continuación se estudió el efecto de la administración prenatal de BSA, ácido linolénico, ácido oleico y curcumina sobre algunas de las alteraciones neuromorfológicas hipocampales que presentan estos animales desde el nacimiento.

Cuando se analizó el volumen del DG, se encontró una marcada reducción en los animales TS tratados con BSA (ANOVA 'cariotipo': $F_{(1,44)}$=11.43, p=0.002, **tabla 17**; **figuras 33A** y **33B**) en comparación con los CO bajo el mismo tratamiento. La administración de estos compuestos produjo un incremento en el volumen de DG de los ratones TS (ANOVA 'tratamiento': $F_{(3,44)}$=4.17, p=0.002; 'cariotipo x tratamiento' $F_{(3,44)}$=1.99, p=0.13, figura **33B**). Al evaluar por separado el efecto de cada compuesto, se observó que el tratamiento con ácido linolénico normalizó completamente el volumen de DG en los animales TS. Por su parte, el tratamiento con ácido oleico produjo un leve aumento del volumen de DG que no alcanzó la significación estadística. Sin embargo, el tratamiento con curcumina no tuvo ningún efecto sobre el volumen de DG de los animales TS (**tabla 17**, **figura 33B**). Por último, la administración de estos compuestos no tuvo ningún efecto sobre esta variable en los 4 grupos de animales CO.

Los ratones TS que recibieron BSA prenatalmente también mostraron un área de la SGZ más pequeña que la de los animales CO (ANOVA 'cariotipo': $F_{(1,45)}$=23.10, p<0.001, figura **33C**). La administración de los tres compuestos, ácido linolénico, ácido oleico y curcumina, atenuó este déficit en los ratones TS (ANOVA 'tratamiento': $F_{(3,45)}$=1.36, p=0.26; 'cariotipo x tratamiento': $F_{(3,45)}$=2.58, p=0.068, figura 16C). Sin embargo, tras analizar de manera individual el efecto de cada tratamiento, el incremento del área de la SGZ fue más notable tras la administración de ácido linolénico que tras la administración de los otros dos compuestos (**tabla 17, figura 33C**).

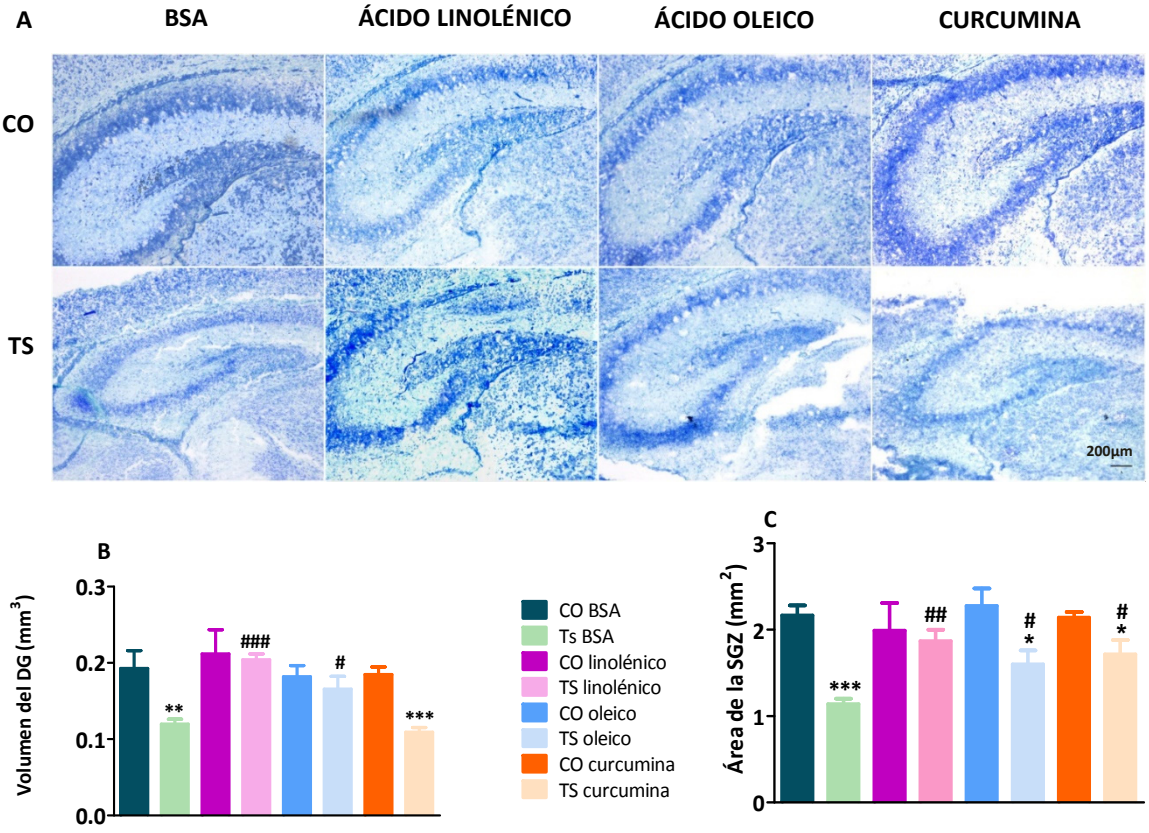

Figura 33. Efecto del tratamiento con ácido linolénico, ácido oleico y curcumina sobre el volumen del DG y el área de la SGZ. Imágenes representativas de la tinción de Nissl sobre las que se estimaron las medidas hipocampales. La barra de escala corresponde a 200 µm (A). Medias ± E.E.M. del volumen DG (B) y del área de la SGZ (C) de las crías TS y CO bajo los distintos tratamientos. *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 TS *vs*. CO; #: p<0.05, ##: p<0.01, ###: p<0.001 ácido linolénico, ácido oleico y curcumina *vs*. BSA. Pruebas de Bonferroni tras ANOVAs significativos.

Tabla 17. Valores F y p del MANOVA ('cariotipo x tratamiento') del volumen del DG y del área de la SGZ para cada tratamiento: ácido linolénico, ácido oleico y curcumina. Los valores estadísticamente significativos (p<0.05) se presentan en negrita

	MANOVAs 'cariotipo x tratamiento'		
Ácido linolénico	**'Cariotipo'** $F_{(1,21)}$	**'Tratamiento'** $F_{(3,21)}$	**'Cariotipo x tratamiento'** $F_{(1,21)}$
Volumen del DG (mm^3)	**3.23, p=0.089**	**5.30, p<0.033**	2.12, p=0.162
Área de la SGZ (mm^2)	**32.63, p<0.001**	1.45, p=0.135	**6.61, p=0.01**
Ácido oleico	**'Cariotipo'** $F_{(1,22)}$	**'Tratamiento'** $F_{(3,22)}$	**'Cariotipo x tratamiento'** $F_{(1,22)}$
Volumen del DG (mm^3)	**7.09, p=0.015**	1.06, p=0.314	2.85, p=0.108
Área de la SGZ (mm^2)	**7.52, p=0.009**	3.66, p=0.071	1.37, p=0.259
Curcumina	**Cariotipo** $F_{(1,23)}$	**Tratamiento** $F_{(3,23)}$	**Cariotipo x tratamiento** $F_{(1,23)}$
Volumen del DG (mm^3)	**29.14, p<0.001**	0.451, p=0.509	0.010, p=0.923
Área de la SGZ (mm^2)	**39.14, p<0.001**	**5.51, p=0.030**	**6.70, p=0.01**

2.4.2. Proliferación de progenitores neurales en la SGZ del hipocampo (BrdU)

Una de las principales alteraciones hipocampales que presentan los animales TS desde el neurodesarrollo es una reducción en la neurogénesis. Por ello, en este Estudio se analizó el efecto de la administración de estos compuestos sobre la proliferación de nuevas células en el DG de los ratones TS y CO.

Los animales TS tratados con BSA mostraron un déficit en la proliferación ya que presentaron una menor densidad de células $BrdU^+$ en su SGZ que los CO (ANOVA 'cariotipo': $F_{(1,47)}$= 7.52, p=0.009, **figuras 34A2** y **34B**). La administración de estos compuestos aumentó significativamente la densidad de células proliferativas en los animales TS (ANOVA 'tratamiento': $F_{(3,47)}$= 3.41, p=0.026, 'cariotipo x tratamiento': $F_{(3,47)}$ =0.36, p= 0.78, **figura 34B**).

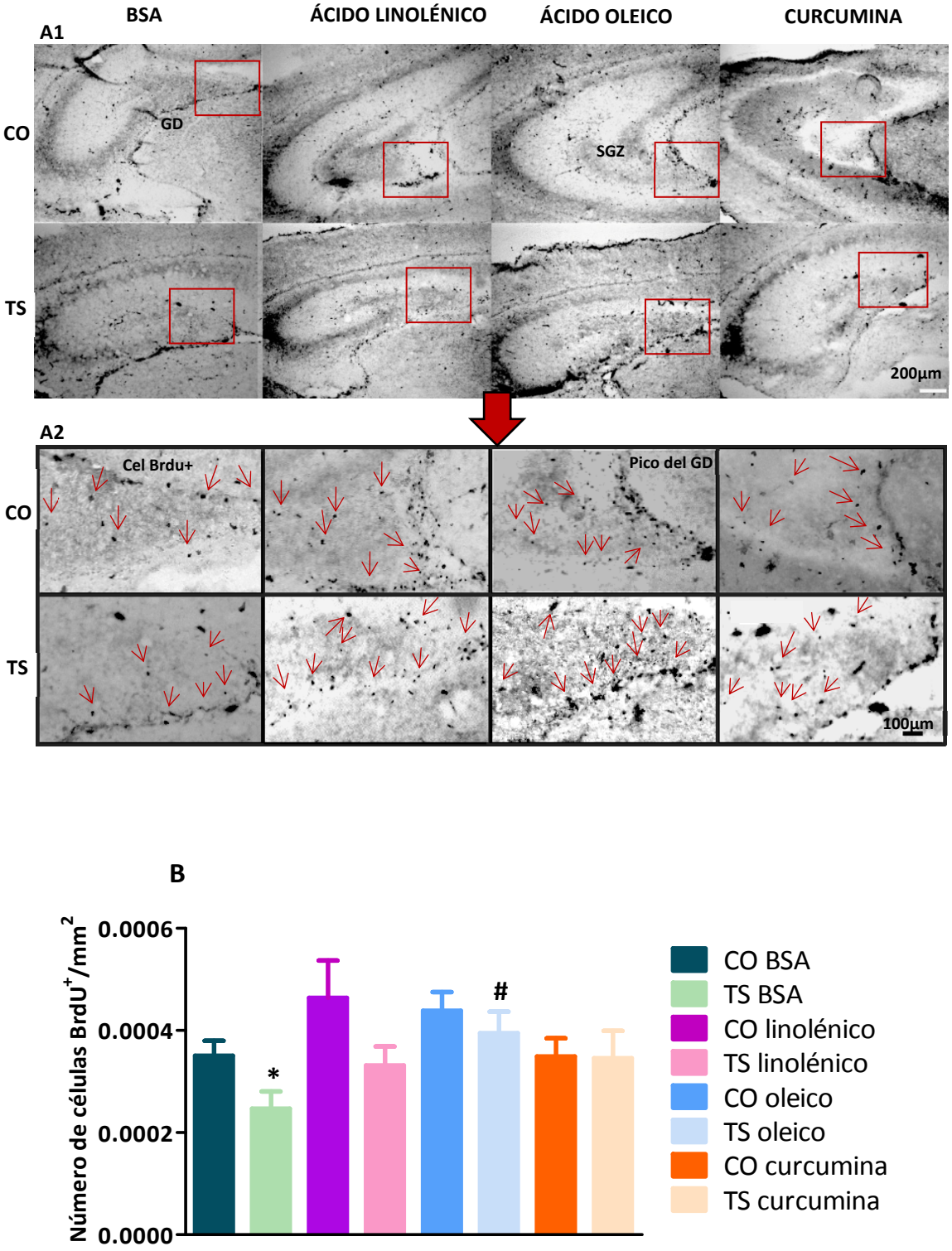

Figura 34. Efecto del tratamiento con ácido linolénico, ácido oleico y curcumina sobre la proliferación celular en la SGZ de los ratones TS. Imágenes representativas del marcaje con BrdU a diferentes escalas (A1 y A2). La barra de escala corresponde a 200 µm (A1) y 100 µm (A2). Medias ± E.E.M de la densidad (B) de las células $BrdU^+$ en el hipocampo de los animales TS y CO tratados con BSA, ácido linolénico, ácido oleico y curcumina. *: p<0.05, TS *vs*. CO; #: p<0.05, ácido linolénico, ácido oleico y curcumina *vs.* BSA. Pruebas de Bonferroni tras ANOVAs significativos.

Al analizar el efecto de cada tratamiento de manera individual, el ácido oleico demostró ser el tratamiento más eficaz para restaurar la densidad de esta población celular en los animales TS **(tabla 18).** Sin embargo, los animales TS tratados con los tres compuestos mostraron valores normales de densidad de células $BrdU^+$, ya que esta densidad no se diferenció de la que presentaban los ratones CO tratados con BSA (**figura 34B**).

Por último, no se encontraron diferencias en la densidad de células $BrdU^+$ de los 4 grupos de ratones CO, aunque los que recibieron ácido linolénico y ácido oleico tendían a mostrar una mayor densidad de este tipo de células (**figura 34B**).

Tabla 18. Valores F y p del MANOVA ('cariotipo x tratamiento') del efecto del tratamiento con ácido linolénico, ácido oleico y curcumina sobre la densidad de células $BrdU^+$ en la SGZ del DG. Los valores estadísticamente significativos (p<0.05) se presentan en negrita

	MANOVAs 'cariotipo x tratamiento'		
Ácido linolénico	**'Cariotipo'** $F_{(1,23)}$	**'Tratamiento'** $F_{(3,23)}$	**'Cariotipo x tratamiento'** $F_{(1,23)}$
Densidad de células $BrdU^+$	**5.56, p=0.030**	3.93, p=0.063	0.085, p=0.77
Ácido oleico	**'Cariotipo'** $F_{(1,25)}$	**'Tratamiento'** $F_{(3,25)}$	**'Cariotipo x tratamiento'** $F_{(1,25)}$
Densidad de células $BrdU^+$	**17.81, p<0.001**	**22.26, p<0.001**	0.035, p=0.853
Curcumina	**'Cariotipo'** $F_{(1,22)}$	**'Tratamiento'** $F_{(3,22)}$	**'Cariotipo x tratamiento'** $F_{(1,22)}$
Densidad de células $BrdU^+$	1.63, p=0.21	1.64, p=0.21	1.71, p=0.20

2.4.3. Densidad celular en el DG del hipocampo

Por último, dado que en los ratones TS la neurogénesis hipocampal también se ve comprometida debido a una disminución en la maduración y supervivencia celular, en este Estudio se evaluó el efecto de la administración prenatal de estos compuestos sobre la densidad de células granulares maduras en el hipocampo.

Los ratones TS tratados con BSA mostraron una menor densidad de células $DAPI^+$ (ANOVA 'cariotipo': $F_{(1,48)}=19.02$, $p<0.001$, **figura 35B, tabla 19**) que los animales CO. Los tres tratamientos aumentaron la densidad de esta población celular en los ratones TS (ANOVA 'tratamiento': $F_{(3,48)}=10.34$, $p<0.001$,'cariotipo x tratamiento': $F_{(3,48)}=1.29$, $p=0.28$).

Al analizar por separado el efecto de cada compuesto sobre la densidad de células $DAPI^+$, se comprobó que todos ellos normalizaban la densidad de células granulares maduras en el DG de los ratones TS y, además, también incrementaron la densidad de estas células en los animales CO (**figura 35B**, **tabla 19**).

Tabla 19. Valores F y p del MANOVA ('cariotipo x tratamiento') de la densidad de células $DAPI^+$ en el DG para cada tratamiento: ácido linolénico, ácido oleico y curcumina. Los valores estadísticamente significativos ($p<0.05$) se presentan en negrita

	MANOVAs 'cariotipo x tratamiento'		
Ácido linolénico	**'Cariotipo'** $F_{(1,22)}$	**'Tratamiento'** $F_{(3,22)}$	**'Cariotipo x tratamiento'** $F_{(1,22)}$
Densidad de células $DAPI^+$	**6.10, p=0.023**	**9.61, p<0.001**	2.04, p=0.17
Ácido oleico	**'Cariotipo'** $F_{(1,23)}$	**'Tratamiento'** $F_{(3,23)}$	**'Cariotipo x tratamiento'** $F_{(1,23)}$
Densidad de células $DAPI^+$	**12.84, p=0.002**	**5.22, p=0.01**	0.31, p=0.73
Curcumina	**'Cariotipo'** $F_{(1,23)}$	**'Tratamiento'** $F_{(3,23)}$	**'Cariotipo x tratamiento'** $F_{(1,23)}$
Densidad de células $DAPI^+$	**9.16, p=0.007**	**13.30, p<0.001**	0.90, p=0.35

Estos resultados sugieren que los tres compuestos aumentan la supervivencia de las células granulares en el DG de los animales TS llegando a normalizar su densidad.

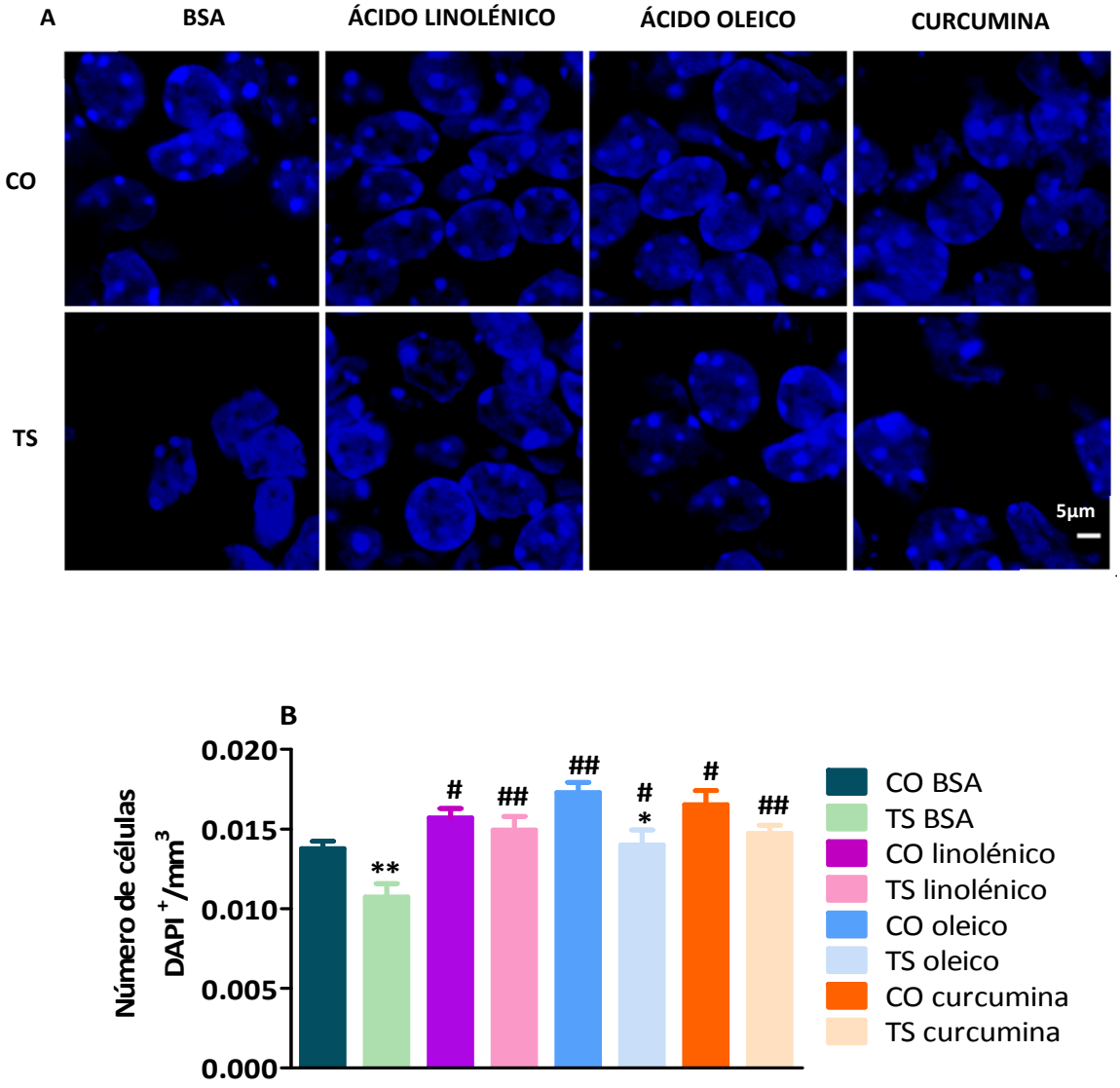

Figura 35. Efectos del tratamiento con ácido linolénico, ácido oleico y curcumina sobre la densidad de células granulares maduras en el DG de los ratones TS y CO. Imágenes representativas de la inmunotinción con DAPI en el DG hipocampal de los distintos grupos de animales. La barra de escala corresponde a 5 µm (A). Medias ± E.E.M de la densidad (B) de las células $DAPI^+$ en el hipocampo de los animales TS y CO tratados con ácido linolénico, ácido oleico, curcumina y BSA. *: p<0.05, **: p<0.01, TS *vs*. CO; #: p<0.05, ##: p<0.01 ácido linolénico, ácido oleico y curcumina *vs*. BSA. Pruebas de Bonferroni tras ANOVAs significativos.

Discusión

1. Estudio 1. Efecto de la administración a largo plazo de un modulador alostérico negativo para la subunidad α5 del receptor $GABA_A$ sobre los déficits cognitivos y neuromorfológicos del ratón Ts65Dn

Como se ha mencionado a lo largo de esta tesis, uno de los mecanismos que parece ser responsable de las alteraciones cognitivas características del SD y del ratón TS es la sobreinhibición mediada por el receptor $GABA_A$ (Fernandez et al., 2007; Kleschevnikov et al., 2012b). Está bien establecido que los receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5 están muy implicados en la regulación de los procesos cognitivos (Collinson et al., 2002; Crestani et al., 2002). De hecho, los estudios realizados en animales, han puesto de manifiesto que la reducción tanto genética como farmacológica de la inhibición mediante el bloqueo de la función del receptor $GABA_A$α5 mejora la memoria y el aprendizaje sin producir efectos adversos en roedores o primates (Collinson et al., 2002; Crestani et al., Ballard et al., 2002; 2009; Potier et al., 2014).

Además, los tratamientos con NAMs selectivos para receptores $GABA_A$ que contienen esta subunidad han demostrado tener efectos pro-cognitivos en ratones TS sin producir efectos secundarios (Braudeau et al., 2011; Martínez-Cué et al., 2013) como convulsiones o un incremento de la ansiedad (Martínez-Cué et al., 2014).

Debido a todos estos antecedentes, el objetivo de este primer estudio fue, por un lado, confirmar la eficacia de la administración a largo plazo de un NAM selectivo para la subunidad α5 del receptor $GABA_A$ (RO4938581) sobre los déficits cognitivos y algunas alteraciones neuromorfológicas que presentan estos animales y, por otro, evaluar si los efectos beneficiosos producidos por el fármaco se mantenían varias semanas después de la interrupción del tratamiento. Para ello se utilizaron dos pautas de administración de RO4938581diferentes. En la primera se administró una dosis diaria de 20mg/Kg de RO4938581 o vehículo durante 12 semanas; mientras que en la segunda se administró la misma dosis diaria a ratones TS y CO solamente durante 4 semanas, después de las cuales todos los ratones recibieron vehículo durante 8 semanas. En ambos casos se evaluó la eficacia del tratamiento sobre los déficits cognitivos del ratón TS durante las 4 últimas semanas en las que el primer grupo seguía recibiendo el fármaco y el segundo no.

1.1. Efectos de la administración de RO4938581 sobre los déficits cognitivos del ratón TS

1.1.1. Efectos sobre las alteraciones en la memoria y el aprendizaje del ratón TS. Mecanismos implicados en los efectos pro-cognitivos

De manera similar a lo descrito en numerosos estudios (Rueda et al., 2010; Martínez-Cué et al., 2013; García-Cerro et al., 2014; Catuara-Solarz et al., 2015; Olmos-Serrano et al., 2016; Stagni et al., 2016), el ratón TS mostró un aprendizaje y memoria de referencia espacial y una memoria de trabajo en el laberinto acuático de Morris deteriorada, ya que presentó una mayor latencia de escape que el grupo CO durante las sesiones de adquisición y a lo largo de los ensayos que se realizaban cada día. Por lo tanto, estos animales tenían mayores dificultades para aprender y recordar la posición de la plataforma.

El tratamiento con RO4938581 durante 4 ó 12 semanas mejoró significativamente los déficits encontrados en el aprendizaje de referencia y memoria espacial en los animales TS durante las 8 primeras sesiones de adquisición, en las que la posición de la plataforma variaba diariamente y durante las 4 sesiones de adquisición extra donde la posición de la plataforma se mantenía constante. Ambas pautas de administración mejoraron también la memoria de trabajo en los animales TS, ya que redujeron la latencia de llegada a lo largo de los ensayos en cada sesión diaria. Estos resultados son similares a los encontrados en los estudios de Braudeau et al. (2011) tras la administración subcrónica de α5IA y de Martínez-Cué et al. (2013) tras el tratamiento crónico de RO4938581 (durante 10 semanas). En el presente estudio, aunque ambas pautas de administración de RO4938581 mejoraron la cognición de los animales TS, los beneficios fueron mayores en el grupo que recibió el fármaco durante 12 que en el que solo lo recibió durante 4 semanas. De hecho, en la prueba de la retirada de la plataforma, solo el tratamiento durante 12 semanas consiguió normalizar en los ratones TS el número de entradas en el cuadrante entrenado, el número de cruces sobre la posición de la plataforma y el porcentaje de tiempo que nadaron por el cuadrante entrenado. Estos resultados indican, que a pesar de que los efectos pro-cognitivos de RO4938581 persisten 8 semanas después de interrumpir su administración, este compuesto es más

eficaz si se administra de forma continuada. Por tanto, aunque este tratamiento ejerce efectos beneficiosos a largo plazo que persisten tras la retirada del fármaco, estos efectos son más mayores cuando el fármaco está presente y actúa sobre su receptor $GABA_A\alpha5$.

Por último, también se evaluó el efecto del tratamiento sobre el aprendizaje procedimental analizando el comportamiento tigmotáctico característico del ratón TS (Escorihuela et al., 1995; García-Cerro et al., 2014). El tratamiento durante 12 semanas mejoró la capacidad de los animales TS para diseñar una buena estrategia de búsqueda de la plataforma, y de nuevo, el tratamiento durante 4 semanas no fue tan efectivo ya que solo produjo una ligera mejoría. Estos resultados son consistentes con otros encontrados anteriormente en los que la administración de NAMs selectivos para $GABA_A\alpha5$ mejoraba el aprendizaje procedimental del ratón TS (Bradeau et al., 2011; Martínez-Cué et al., 2013).

Los efectos pro-cognitivos encontrados tras ambas pautas de administración de RO4938581 parecen no ser debidos a diferencias motivacionales o motoras ya que no se encontraron diferencias en la ejecución de los distintos grupos durante las sesiones de aprendizaje guiado.

De manera consistente con los resultados encontrados en los estudios anteriores (Braudeau et al., 2011; Martínez-Cué et al., 2013) en los que no se observó un efecto de los NAMs sobre el aprendizaje del grupo CO, en este estudio la administración de RO4938581 tampoco modificó los distintos procesos cognitivos evaluados de los animales CO. Esta falta de efecto pudo deberse a un “efecto techo” es decir, a que el protocolo experimental utilizado no permitiera detectar una mejoría adicional en el aprendizaje espacial de estos ratones tras la administración del fármaco. El hecho de que el efecto pro-cognitivo tras la modulación negativa farmacológica sea mayor en animales TS también puede deberse a que la reducción de la inhibición sea más eficaz en aquellos animales que tienen un exceso de la misma que en los que tienen un balance excitador-inhibidor adecuado, o a que en estos últimos se produzcan mecanismos compensatorios.

Para evaluar el efecto de RO4938581 sobre otros procesos cognitivos, se analizó el aprendizaje y la memoria de asociación mediante la prueba del condicionamiento del miedo. De la misma manera que en estudios anteriores (Vidal et al., 2012; García-Cerro et al., 2014), el grupo TS mostró un deterioro en los dos procesos de asociación, al tono y al contexto, en comparación con el grupo CO. En ambas sesiones, los animales TS permanecieron menos tiempo inmóviles que los animales CO, lo que demuestra que tienen más dificultad para recordar la asociación de un estímulo neutro (tono o contexto visual) al estímulo aversivo (descarga).

La amígdala es fundamental en la consolidación de la memoria asociativa en la que hay un componente emocional: la relación entre un estímulo neutro acústico y un estímulo aversivo que provoque miedo (Campeau y Davis, 1995; Goosens y Maren, 2001; McGaugh, 2004). A pesar de que algunos trabajos indican que esta estructura se mantiene relativamente intacta en los ratones TS (Salehi et al., 2009; Kleschevnikov et al., 2012a), otras estructuras como las cortezas entorrinal y perirrinal (Anagnostaras et al., 2001; Biedenkapp y Rudy, 2009), corteza prefrontal (Rozeske et al., 2015; Bergstrom, 2016), tálamo (Arias et al., 2015) y cerebelo (Anagnostaras et al., 2001; Lee y Kesner, 2004) tienen un papel importante en este tipo de memoria. Estas estructuras sí están afectadas en el ratón TS (Belichenko et al., 2004; Dierssen, 2012; Cramer et al., 2015), lo que podría tener un papel en las alteraciones que presentan estos animales en el condicionamiento acústico.

Ambas pautas de administración de RO4938581 mejoraron la memoria de asociación tono-descarga de los ratones TS aunque solo se alcanzó la significación estadística tras el tratamiento durante 12 semanas. Aunque los receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5 se encuentran principalmente en el hipocampo, también están presentes en la amígdala de humanos y ratones (Stokes et al., 2014; Martín et al., 2014). Por tanto, no se puede descartar que la administración de RO4938581 esté ejerciendo algún efecto sobre estos receptores en la amígdala y por tanto mejorando la memoria de asociación tono-descarga.

En cuanto a la memoria de asociación contextual ninguna de las dos pautas de administración de RO4938581 consiguió rescatar los déficits observados en animales TS

y tampoco tuvo efectos sobre los animales CO. El hecho de que este compuesto ejerza un efecto pro-cognitivo en el laberinto acuático de Morris y no mejore la memoria contextual de los animales TS podría deberse a que, aunque ambas pruebas dependen principalmente del hipocampo, son tareas diferentes, en las que intervienen estructuras anatómicas y redes funcionales distintas. En este sentido, diversas estructuras que no han sido estudiadas en esta tesis como las cortezas entorrinal y perirrinal y las aferencias cerebelares, que están afectadas en el ratón TS, también parecen estar implicadas en el aprendizaje contextual (Anagnostaras et al., 2001; Biedenkapp y Rudy, 2009). Por tanto, la administración de este NAM podría no estar modulando la actividad de estas áreas por la baja concentración de los receptores $GABA_A$ α5 encontradas en ellas.

Por otro lado, aunque la sobreinhibición producida por la actividad excesiva del sistema GABAérgico es uno de los mecanismos subyacentes a los déficits cognitivos presentes en el ratón TS (Martínez-Cué et al., 2014), no es el único. En este sentido, la sobrexpresión de los productos de otros genes triplicados como *Dyrk1A*, *Olig1* y *Olig2* también tienen un importante papel en la aparición de los déficits cognitivos y en la sobreinhibición encontrada en el ratón TS (Chakrabarti et al., 2010; Delabar et al., 2014; De la Torre et al., 2014; García-Cerro et al., 2014). Por tanto, este podría ser otro de los motivos por el cual la reducción de la inhibición mediada por $GABA_A$α5 a través de la administración de RO4938581 no fuera suficiente para restaurar completamente la funcionalidad cognitiva contextual de este modelo de SD.

1.1.1.1. Balance de inhibición-excitación en el hipocampo

Para valorar si los efectos pro-cognitivos encontrados en los animales TS tras la administración durante 4 ó 12 semanas de RO4938581 podían deberse a la corrección del desequilibrio entre la densidad de sinapsis excitadoras e inhibitorias en el hipocampo, se cuantificó la expresión del marcador de sinapsis GABAérgicas inhibitorias VGAT y la expresión del marcador de sinapsis glutamatérgicas excitadoras VGluT1 y se calculó el ratio de expresión de ambos marcadores en los distintos grupos de animales.

De acuerdo con lo observado en trabajos anteriores (Belichenko et al., 2009; Pérez-Cremades et al., 2010; Martínez-Cué et al., 2013), el ratón TS presentó una marcada sobreinhibición en la capa molecular del DG con respecto al ratón CO que se manifestó

en un incremento de la expresión de VGAT y en una reducción de la expresión de VGluT1, generando un desequilibrio inhibidor-excitador (ratio VGluT1/VGAT) en favor de la inhibición.

Estudios anteriores demuestran que el bloqueo del gen *Gabra5*, que codifica el receptor $GABA_A\alpha5$ (Vidal et al., 2017, datos no publicados), o la administración crónica de RO4938581 (Martínez-Cué et al., 2013) producen una reducción de la expresión de diferentes marcadores de botones sinápticos inhibitorios. También se ha demostrado que la inhibición de los receptores $GABA_A\alpha5$ potencia la neurotransmisión glutamatérgica (Collinson et al., 2002, Maubach, 2003, Atack et al., 2006, Martin et al., 2009; Pofantis y Papatheodoropoulos, 2014) y modifica la distribución y fosforilación de receptores glutamatérgicos en la médula espinal (Xue et al., 2017). De manera consistente con estos resultados, en el presente estudio, la administración, durante 4 ó 12 semanas, de RO4938581 restauró el balance inhibidor/excitador al producir una normalización de la densidad de botones inhibitorios y excitadores. Por tanto, estos resultados sugieren que uno de los mecanismos por los que la administración de RO4938581 de manera continuada o durante 4 semanas mejora la memoria y el aprendizaje espacial en los animales TS restaurando el balance inhibidor-excitador de su hipocampo, efecto que se mantiene 8 semanas después de retirar el tratamiento.

Por otro lado, aunque en el grupo de animales CO tratados durante 12 semanas hubo una reducción de los botones VGAT, la administración de RO4938581 no afectó al ratio VGluT1/VGAT, lo que sugiere que se hayan producido mecanismos compensatorios para mantener el correcto balance inhibidor-excitador de los circuitos cerebrales del SNC del ratón euploide.

1.1.1.2. Neurogénesis y la supervivencia neuronal

Dado que el sistema GABAérgico está implicado en la regulación de la neurogénesis hipocampal (Tozuka et al., 2005; Ge et al., 2006; Earnheart et al., 2007; Song et al., 2012), su desequilibrio podría subyacer a los déficits cognitivos del ratón TS. De hecho, al igual que en estudios anteriores (Rueda et al., 2005; Llorens-Martín et al., 2006; Bianchi et al., 2010a, b; Rueda et al., 2010), en este trabajo, el ratón TS presentó una menor densidad

de células proliferativas, de neuroblastos en distintos estadios de diferenciación y una hipocelularidad de células granulares en el DG.

La neurogénesis hipocampal adulta tiene un importante papel en el aprendizaje y memoria y en la LTP (Shors et al., 2001; Deng et al., 2010; Ming y Song, 2011; Garthe y Kempermann, 2013). La reducción de la neurogénesis deteriora las capacidades cognitivas y la LTP (Kempermann y Gage, 2002; Garthe et al., 2009; Coremans et al., 2010; Singer et al., 2011; Burghardt et al., 2012; Iscru et al., 2013), mientras que su incremento en animales que presentan alteraciones en estos procesos, como en el ratón TS, tiene un efecto pro-cognitivo (Bianchi et al., 2010a, b; Contestabile et al., 2013).

La reducción farmacológica de la inhibición mediada por el receptor $GABA_A\alpha5$ tras la administración durante 4 ó 12 semanas de RO4938581 recuperó completamente el proceso neurogénico de los ratones TS, lo que indica que este podría ser otro de los mecanismos que subyace a la mejoría cognitiva. Estudios previos de este laboratorio demostraron que la administración crónica del mismo NAM mejoraba la proliferación y el número total de células granulares en el hipocampo de estos animales (Martínez-Cué et al., 2013). El presente trabajo demuestra, que este compuesto también recupera la densidad de diferentes poblaciones de neuroblastos en distintos estadios de diferenciación, por tanto, parece que también promueve la diferenciación y/o maduración neuronal. Estos nuevos resultados son, además, consistentes con los encontrados en trabajos previos del laboratorio en los que tras reducir la inhibición mediada por el receptor $GABA_A\alpha5$ a través del bloqueo del gen *Gabra5* en el ratón TS, se observó una recuperación del proceso neurogénico completo, incluyendo la diferenciación neuronal (Vidal et al., 2017, datos no publicados). Por tanto, la normalización de la hipocelularidad hipocampal en el grupo TS tras la reducción de la inhibición farmacológica mediada por $GABA_A\alpha5$ se debió por un lado al aumento de precursores neurogénicos y por otro a la normalización de la diferenciación y maduración neuronal, favoreciendo que un mayor número de neuronas maduras consiguieran integrarse en la capa granular del hipocampo. De nuevo, y de manera consistente a lo encontrado en la cognición, los efectos de RO4938581 sobre la neurogénesis hipocampal fueron ligeramente mayores cuando se administró el fármaco

de manera continuada que cuando se interrumpió su administración durante 8 semanas.

En el caso de los ratones CO el tratamiento no tuvo ningún efecto sobre la neurogénesis hipocampal. Estos resultados son consistentes con los encontrados por Vidal et al. (2017 datos no publicados) en los que tras la reducción de la dosis del gen *Gabra5*, en el grupo CO no se observó ningún efecto en la proliferación, diferenciación o supervivencia celular.

El presente trabajo muestra que el efecto en la reducción de la inhibición mediada por el receptor $GABA_A\alpha5$ a través de la administración de RO4938581 se mantiene tras la interrupción del tratamiento, aunque este efecto es más eficaz, mejorando en mayor medida la cognición, el balance inhibidor/excitador y la neurogénesis, si el NAM se administra de manera continuada y el receptor se encuentra en todo momento en contacto con el fármaco. Aun así, los resultados encontrados tras la administración del NAM durante 4 semanas y su posterior interrupción durante 8, son consistentes con otros estudios en los que se evaluó la eficacia de la administración del antagonista no selectivo del receptor $GABA_A$ PTZ a ratones TS (Fernández et al., 2007; Colas et al., 2013). Estos autores observaron que dos meses después de la interrupción de la administración de PTZ los ratones TS presentaban una memoria similar a la de los CO. Dado que este fármaco tiene una vida media de menos de 5 horas, los autores propusieron que el tratamiento crónico con PTZ produjo una modificación de larga duración del circuito neuronal o redujo la sensibilidad a GABA de circuitos clave implicados en el aprendizaje y la memoria de los ratones TS (Fernández et al., 2007; Colas et al., 2013). Por tanto, aunque se interrumpa la administración del compuesto, es posible que el tratamiento durante solo 4 semanas haya inducido cambios neuroanatómicos y/o neuroquímicos (por ejemplo, desensibilización de receptores) que persistan en el tiempo contribuyendo a mejorar las alteraciones en el balance inhibidor/excitador, en la neurogénesis hipocampal y en la cognición de los ratones TS.

1.2. Efecto sobre la actividad exploratoria y la capacidad de atención

Para valorar el papel de la administración de RO4938581 sobre la atención y la actividad exploratoria se realizó la prueba de la tabla de agujeros. Los animales CO tienden a

presentar un comportamiento más cauteloso ante una nueva situación, mientras que el ratón TS suele mostrar una mayor actividad general, recorriendo más distancia y a mayor velocidad en el aparato (Reeves et al., 1995; Escorihuela et al., 1995; Coussons-Read y Crnic, 1996), debido a que estos ratones presentan una reducción de la atención hacia estímulos potencialmente peligrosos (Crnic y Pennington, 2000). Sin embargo, en este trabajo no se encontraron diferencias significativas en la actividad o en la capacidad de atención entre los animales TS y CO.

El tratamiento durante 12 semanas con RO4938581 no tuvo ningún efecto sobre la hiperactividad o la capacidad de atención de los animales TS o CO. Sin embargo, cuando el compuesto se administró durante 4 semanas fue capaz de aumentar de forma significativa el tiempo de exploración en ambos cariotipos. Estos resultados concuerdan con los encontrados tras el tratamiento con RO4938581 (Martínez-Cué et al., 2013) y con otro NAM selectivo para el receptor $GABA_A\alpha5$, el R1 (Vidal et al., 2017, datos no publicados), que produjeron la misma tendencia a mejorar la capacidad de atención. La modulación serotonérgica en la corteza frontal y la colinérgica del prosencéfalo basal son los principales responsables de la capacidad de atención (Carter et al., 2005; Knudsen, 2007; Krinsky-McHale et al., 2008; Enge et al., 2012). Por tanto, la tendencia a mejorar esta capacidad tras la administración de RO4938581 pudo deberse a un efecto indirecto del tratamiento sobre algunos de estos circuitos. Sin embargo, al no encontrar efecto tras la administración del fármaco durante 12 semanas y al no corregirse ninguno de los otros parámetros relacionados con la atención (número de exploraciones o índice ABA) no parece claro el efecto del fármaco sobre esta capacidad, y por tanto, sus efectos pro-cognitivos no son atribuibles a una mejoría de la misma.

1.3. Efectos sobre la actividad general

Una de las alteraciones comportamentales del ratón TS es la hiperactividad ante una situación novedosa y estresante como puede ser una zona abierta e iluminada en la prueba del campo abierto o un espacio elevado del suelo en el laberinto elevado en cruz (Escorihuela et al., 1995; Reeves et al., 1995; Martínez-Cué et al., 2006). Esta hiperactividad del ratón TS, como ya se ha indicado, es probablemente debida a la menor atención a estímulos potencialmente peligrosos (Demas et al., 1996; Crnic y

Pennington, 2000). Como era de esperar, los animales TS de este estudio se mostraron ligeramente hiperactivos en las pruebas del campo abierto y laberinto en cruz en relación a los ratones CO. En el campo abierto, los ratones TS recorrieron una distancia mayor en el centro y en la periferia del aparato y realizaron un mayor número de entradas a ambas zonas, aunque los resultados no llegaron a ser estadísticamente significativos. En el laberinto elevado en cruz, los ratones TS realizaron un mayor número de entradas en los brazos abiertos.

El tratamiento con RO4938581 durante 4 ó 12 semanas no afectó a la actividad de los animales TS en el laberinto en cruz o en el campo abierto. Aunque sus efectos no alcanzaron la significación estadística, ambos tratamientos produjeron una ligera reducción de la hiperactividad disminuyendo la distancia total recorrida y el número de entradas al centro y la periferia del aparato. Además, ninguno de los tratamientos modificó las conductas evaluadas en estas pruebas en los animales CO. Estos resultados son consistentes con los encontrados en estudios anteriores (Collinson et al., 2002; Crestani et al., 2002; Yee et al., 2004; Braudeau et al., 2011; Martínez-Cué et al., 2013) que demuestran que la inhibición farmacológica del receptor $GABA_A\alpha5$ no produce efectos sobre la actividad de los animales euploides, pero si puede reducir la hiperactividad en el grupo TS.

1.4. Efectos sobre la ansiedad

Mientras que la inhibición del receptor $GABA_A$ de manera no selectiva provoca un efecto ansiogénico (Wetmore y Garner, 2010), el bloqueo selectivo de la subunidad α5 de este receptor no induce ansiedad. Estos resultados se han observado tanto en animales sin déficit cognitivos, en los que el gen *Gabra5* que codifica los receptores $GABA_A\alpha5$ ha sido bloqueado (Collinson et al., 2002; Crestani et al., 2002; Yee et al., 2004), como en animales con y sin déficits de aprendizaje que han recibido diferentes NAMs selectivos para el receptor $GABA_A\alpha5$ (Ballard et al., 2009; Martínez-Cué et al., 2013; Potier et al., 2014).

En las pruebas del campo abierto y el laberinto elevado en cruz existe un conflicto entre la tendencia a explorar nuevos ambientes y la aversión natural de los ratones a los espacios abiertos (Treit et al., 1993). Para evaluar la ansiedad se cuantifica el tiempo que

pasa el animal en los espacios abiertos, el centro en el caso del campo abierto y los brazos abiertos en el del laberinto elevado en cruz. Un menor tiempo en estas zonas indica una mayor ansiedad en el animal. Por otra parte, el número de alzamientos y de conductas de evaluación de riesgo que realiza el animal con el fin de escapar del aparato también son índices de ansiedad, un mayor número de estas conductas representa un mayor nivel de ansiedad.

En las pruebas del campo abierto y el laberinto elevado en cruz no se observaron diferencias significativas en la ansiedad de los ratones TS y CO tratados con vehículo. Aunque en el campo abierto, los ratones TS tuvieron una tendencia a recorrer mayor distancia en el centro del aparato que los CO, lo que podría ser interpretado como una reducción de ansiedad, este grupo también realizó un número ligeramente mayor de entradas en la periferia y en el centro. Por tanto, la mayor distancia en la zona central del aparato no era debida a una menor ansiedad sino a su hiperactividad. Durante la prueba del laberinto elevado en cruz también se observó que el grupo TS realizaba un mayor número de entradas en los brazos abiertos del aparato que el grupo CO. Al igual que en el caso anterior, es probable que la hiperactividad del grupo TS sea responsable de este comportamiento.

Tras la administración de RO4938581 durante 4 ó 12 semanas no se observaron modificaciones en la ansiedad en ninguno de los grupos animales. Anteriormente ya se había demostrado que el bloqueo selectivo de los receptores $GABA_A\alpha5$ con éste u otros NAMs en animales TS y CO o en ratones salvajes (Dawson et al., 2006; Ballard et al., 2009; Bradeau et al., 2011; Martínez-Cué et al., 2013; Vidal et al., 2017, datos no publicados) o mediante el bloqueo del gen *Gabra5* en el ratón TS (Vidal et al., 2017, datos no publicados) no produce efectos ansiogénicos.

1.5. Efectos sobre los reflejos sensoriales y la coordinación motora.

Por último, se valoró el posible efecto del tratamiento durante 4 ó 12 semanas con RO4938581 sobre los reflejos y habilidades motoras de los animales. Aunque los animales TS no mostraron diferencias con respecto a los animales CO en la mayoría de las habilidades sensorimotoras valoradas (visión, sensibilidad táctil, reflejo de enderezamiento, fuerza de agarre y equilibrio sobre la barra de madera y aluminio), sí

presentaron una tendencia a mostrar una peor coordinación motora en la prueba de la percha y en el rotarod en el ensayo de mayor velocidad. Aunque se han descrito diversas alteraciones, que van desde moderadas a severas, en el equilibrio y la coordinación motora de ratones TS entre 4 y 7 meses de edad (Costa et al., 1999), la mayoría de los estudios muestran que las habilidades sensorimotoras de los ratones TS adultos se encuentran relativamente intactas (Escorihuela et al., 1995; Holtzman et al., 1996; Rueda et al., 2010).

El tratamiento con RO4938581 durante 4 ó 12 semanas no afectó a ninguna de las habilidades sensoriales o a la coordinación motora de los ratones TS y CO. Estos resultados son consistentes con los encontrados en estudios anteriores en los que se observó que las capacidades sensoriales y la coordinación motora no eran modificadas por la administración de distintos NAMs selectivos en distintos modelos murinos, incluyendo el ratón TS (Ballard et al., 2009; Braudeau et al., 2011; Martínez-Cué et al., 2013), o por el bloqueo del gen *Gabra5* (Collinson et al., 2002). Por consiguiente, los efectos beneficiosos que este compuesto ejerció a nivel cognitivo en los ratones TS no parecen ser debidos a una mejoría de la coordinación motora, habilidades sensorimotoras y/o de la actividad general de estos animales.

2. Estudio 2. Efecto de la administración prenatal de ácido linolénico, ácido oleico y curcumina sobre la neurogénesis hipocampal del ratón TS

Como se ha mencionado a lo largo de esta tesis, en el SD muchas de las alteraciones fenotípicas comienzan en etapas prenatales y van acentuándose en el transcurso de la vida. Una de las más relevantes, tanto en las personas con SD como el ratón TS, son las anomalías en la neurogénesis (Chakrabarti et al., 2007; Larsen et al., 2008; Guidi et al., 2008; 2011) que incluyen fallos en la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia celular (Bahn et al., 2002; Esposito et al., 2008; Contestabile et al., 2009a; Flórez et al., 2015). Estas alteraciones dan lugar a una marcada hipocelularidad (Gandolfi et al., 1981; Baxter et al., 2000) y a un volumen encefálico reducido (Guihard-Costa et al., 2006; Guidi et al., 2008; 2011) que influirá en los déficits cognitivo-conductuales observados en el SD.

En la actualidad, no existe ningún tratamiento farmacológico eficaz para paliar la discapacidad intelectual de las personas con SD. En los modelos animales de SD, la mayoría de los tratamientos se han probado en ratones adultos (Bartesaghi et al., 2011). Sin embargo, los estudios más recientes apuntan a la necesidad de corregir los déficits neurogénicos administrando sustancias seguras y trasladables al humano mientras se está formando el cerebro; es decir, de manera prenatal o postnatal temprana (Guidi et al., 2008; 2014; Bianchi et al., 2010; Incierti et al., 2012).

Por ello, el objetivo de este segundo estudio fue evaluar los efectos de la administración en estadios prenatales de tres sustancias con un alto potencial neurogénico (ácido oleico, ácido linolénico y curcumina) sobre las alteraciones neuroanatómicas y neuromorfológicas hipocampales encontradas en el ratón TS en el día postnatal 2.

Dado que estos compuestos no presentan toxicidad y que no se han observado efectos secundarios importantes tras su administración, su uso ha sido aprobado en humanos y su eficacia en distintas patologías está siendo evaluada en varios ensayos clínicos (Ng et al., 2006; Malar y Devi, 2010; Ávila-Martín et al., 2011; Bloch et al., 2011; Sanmukhani, 2014; Vacca et al., 2015).

2.1. Análisis de los niveles plasmáticos de ácido linolénico, ácido oleico y curcumina

Varios estudios han demostrado que las tres sustancias administradas en el presente trabajo son capaces de atravesar la barrera placentaria y hematoencefálica para ejercer sus beneficios en el cerebro durante el neurodesarrollo (Ganiger et al., 2006; Darvesh et al; 2012; Liu et al 2015; Cutuli et al., 2016). En el presente trabajo, las crías de las madres TS tratadas con ácido oleico o con ácido linolénico durante la gestación presentaron un incremento en los niveles de estos ácidos grasos en plasma. Por tanto, parece que estas sustancias fueron adecuadamente transferidas a las crías, incorporadas a la circulación y distribuidas por el organismo.

Sin embargo, no se detectó curcumina en el plasma de las crías cuyas madres habían recibido esta sustancia. Estos resultados no son extraños teniendo en cuenta su corta vida media (Darvesh et al., 2012; Ullah et al., 2017). Diversos trabajos han demostrado que tras la administración de curcumina, esta molécula muestra baja biodisponibilidad y niveles plasmáticos extremadamente bajos o incluso indetectables debido a su baja absorción y a su rápido metabolismo y eliminación (revisado por Anand et al., 2007). Este podría ser el motivo por el que en este trabajo no se ha detectado curcumina en el plasma de las crías, ya que la extracción de las muestras de sangre se realizó dos horas después del tratamiento. Futuros estudios deberían detectar metabolitos secundarios de la curcumina como glucurónidos de curcumina y/o THC poco tiempo después de administrar la sustancia. Por último, dado que la sensibilidad del aparato de HPLC utilizado solo permite la detección de niveles de curcumina mayores de 10 ng/ml, también es posible que los niveles en las crías fueran menores y no haya sido posible su detección. Un aparato de HPLC más sensible o su detección por medio de otra técnica como la espectrofotometría de masas podrían solventar este problema en el futuro.

2.2. Efecto sobre la viabilidad en el parto y la natalidad

Para comprobar los efectos de los tres tratamientos sobre la viabilidad en el parto y la natalidad se llevó a cabo un seguimiento del estado de las hembras durante la de gestación y de sus crías en los estadios postnatales P1 y P2.

Estudios anteriores sugieren que la administración de ácido oleico o linolénico en la dieta durante el período gestacional o en el parto no modifican la viabilidad o supervivencia de las crías (Coti et al., 2006; Cutuli et al., 2014; 2016). De hecho, se ha demostrado que la administración de ácido linolénico incrementa la supervivencia de ratones tras la exposición a un compuesto tóxico llamado soman que produce pérdida de peso corporal (Piermartiri et al., 2015). En el presente Estudio, ninguno de los tres compuestos afectó al porcentaje de hembras que llevaron a término la gestación o al porcentaje de mortalidad tras el nacimiento. Además, las crías de las hembras tratadas con ácido linolénico fueron las que mostraron un menor porcentaje de muerte perinatal. Por tanto, no se puede descartar que este compuesto esté ejerciendo un efecto beneficioso sobre la supervivencia de las crías tras administrarlo a hembras TS durante la etapa de gestación.

El tratamiento con los ácidos linolénico y oleico tampoco modificó el porcentaje de abortos espontáneos, sin embargo, este parámetro se redujo tras el tratamiento con curcumina. Aunque se ha descrito que la curcumina puede producir citotoxicidad sobre la proliferación celular en blastocistos de ratón aumentando el número de abortos espontáneos (Chen et al., 2010; 2012), esta citotoxicidad solo se observa durante las primeras etapas de desarrollo, después de la implantación del embrión entre los días 3 y 8 de la gestación (Huang et al., 2013). Dado que en el presente estudio las hembras TS comenzaron a tratarse a partir del día 10 de gestación, es posible que a partir de este momento la curcumina pudiera ejercer un efecto beneficioso disminuyendo los abortos espontáneos de las hembras TS. De hecho, nuestros resultados son consistentes con el reciente estudio llevado a cabo por Zhou et al. (2017) en el que la administración de curcumina desde el estadio 13 al 16 de gestación a ratones hembras con síndrome de inflamación placentaria produjo una disminución del índice de abortos espontáneos, de la reabsorción de embriones y un incremento del número de crías nacidas.

Por otro lado, en este estudio se ha encontrado un aumento del número de crías rechazadas por madres tratadas con ácido oleico y con ácido linolénico.

En los primeros días después del parto se debe manipular lo menos posible tanto a las madres como a las crías, ya que su manipulación puede ocasionar un aumento en los

niveles de estrés de ambas, así como un abandono o canibalismo por parte de las madres (Batchelor et al., 1998). El hecho de que las crías tratadas con ácidos grasos durante los días postnatales P1 y P2 fueran rechazadas más que las tratadas con el BSA podría deberse a que la textura o el olor de los ácidos grasos (oleico y linolénico) pudieran resultar más extraños que el BSA para las madres, pudiendo influir negativamente sobre su comportamiento hacia las crías. Además, el canibalismo en mamíferos suele ser más común y frecuente si la madre se encuentra sometida a estrés, por ejemplo porque las camadas son muy grandes y hay un hacinamiento de las crías (DeSantis y Schmaltz, 1984), para lograr la supervivencia del resto. En este estudio, las camadas de las hembras tratadas con ácidos grasos fueron mayores que las de las hembras tratadas con BSA o con curcumina, por tanto, esta podría ser otra de las razones por la que aumentó el rechazo de las crías tratadas con estos compuestos.

2.3. Efecto sobre el peso corporal y cerebral

Dado que los ratones TS muestran un déficit en el peso corporal y cerebral en el período embrionario (Aldridge et al., 2007; Chakrabarti et al., 2007), quisimos comprobar si las sustancias administradas en este estudio eran capaces de corregir estas alteraciones. El tratamiento prenatal con ácido oleico aumentó el peso corporal y cerebral de las crías. Sin embargo, la administración de ácido linolénico o de curcumina no tuvo ningún efecto sobre estas variables.

En humanos, la transferencia de ácidos grasos al feto durante el periodo de gestación es un factor clave en el crecimiento y ganancia de peso fetal y en el neurodesarrollo (Larqué et al., 2014). Por tanto, es posible que la administración de ácido oleico durante el periodo de gestación a las hembras TS sea responsable de la ganancia de peso corporal y cerebral de sus crías. Además, el ácido oleico y sus derivados se encuentran en altas concentraciones en los huesos de rata y ratón en los que aumentan los procesos de mineralización ósea (During et al., 2015), lo que también podría explicar el aumento de peso corporal encontrado en el presente estudio tras la administración de ácido oleico.

Sin embargo, parece que una dieta rica en ácidos grasos Ω3 (incluido el ácido linolénico) reduce la grasa corporal y la obesidad en rata y ratón (Madsen et al., 2012; 2015; Jacokbsen et al., 2017). Por otro lado, varios estudios han demostrado que tras la

administración de ácido linolénico no se modifica el peso corporal en ratones envejecidos (Cutuli et al., 2016), en ratones que habían disminuido su peso debido a la administración de un compuesto tóxico, el soman (Piermartiri et al., 2015), o en ratas con el síndrome renal poliquístico donde, además de la falta de efectos sobre el peso corporal, tampoco se encontró una recuperación de los procesos de mineralización ósea en los animales enfermos o sanos (Madizt et al., 2015). Además, la suplementación a mujeres embarazadas con una mezcla de ácidos Ω3 que contenía ácido linolénico, no produjo cambios en el peso fetal (Carlsen et al., 2013). En el presente estudio, la administración de ácido linolénico a hembras TS tampoco produjo ningún efecto sobre el peso corporal o cerebral de sus crías.

Por último, la curcumina es un potente fitoquímico que induce la movilización de las grasas a través de la termogénesis y la modulación de las enzimas responsables de la β-oxidación. Por tanto, puede inducir una pérdida de peso corporal en algunas situaciones patológicas (Rupasinghe et al., 2016), por lo que no es de extrañar que su administración durante la gestación tampoco aumente el peso corporal de las crías de este estudio.

2.4. Efecto sobre las alteraciones anatómicas y neuromorfológicas hipocampales

2.4.1. Efectos sobre las alteraciones neuroanatómicas del hipocampo

De manera consistente con otros trabajos que demuestran una reducción en el tamaño de diferentes áreas del hipocampo desde el periodo embrionario (Bianchi et al., 2010a; 2010b), en este estudio se encontró una disminución del volumen del DG y del área de la SGZ de los ratones TS en el día postnatal 2.

La administración de los ácidos linolénico y oleico a hembras TS gestantes incrementó el volumen del DG y el área de la SGZ de sus crías TS. Sin embargo, en estos animales, la administración de curcumina aumentó el área de la SGZ, pero no el volumen de DG. La reducción de las áreas cerebrales en el ratón TS está relacionada con una disminución del número final de células en estas estructuras como consecuencia de las anomalías en el proceso neurogénico. Se ha demostrado que la administración prenatal a ratones TS de compuestos que incrementan la neurogénesis, como el inhibidor de la recaptación de 5-HT fluoxetina, normaliza las alteraciones anatómicas de estos

animales (Guidi et al., 2014). Por tanto, es posible que la reducción de las anomalías neuroanatómicas hipocampales ocasionadas por los 3 compuestos esté mediada por sus efectos beneficiosos sobre la neurogénesis hipocampal (ver apartado 2.4.2).

De los dos ácidos grasos administrados en este estudio, el que ejerció mayores efectos en los animales TS fue el ácido linolénico, ya que normalizó tanto el volumen del DG como el área de la SGZ. Se ha demostrado que la administración durante 6 semanas de este compuesto incrementa el volumen del hipocampo en ratones de dos meses de edad (Venna et al., 2009). Además, la administración durante 8 semanas de una dieta rica en ácidos grasos de la serie Ω3, que contenía ácido linolénico, aumenta el volumen del hipocampo de ratones de avanzada edad (Cutuli et al., 2016). Mientras que una dieta deficiente en ácidos grasos poliinsaturados de la serie Ω3 (con un déficit de ácido linolénico) durante el periodo de gestación, altera el desarrollo normal del cerebro reduciendo el grosor de la zona ventricular, corteza cerebral y el DG del hipocampo en embriones de rata (Coti-Bertrand et al., 2006). Por lo tanto, el aporte adicional de ácido linolénico a hembras TS gestantes podría influir de manera positiva en el desarrollo cerebral prenatal, restaurando el tamaño de las capas y las estructuras hipocampales de sus crías. Es posible que los mismos procesos sean responsables de la normalización de las alteraciones neuroanatómicas del hipocampo encontradas en ratones TS tras la administración de ácido oleico a sus madres durante la gestación.

Sin embargo, la arquitectura de la anatomía hipocampal en desarrollo no es igual a la anatomía adulta y durante estas etapas el DG aún no presenta su forma y volumen definitivo. El hecho de que la curcumina no llegue a corregir completamente el volumen del DG pero sí corrija el área de la SGZ, puede deberse a que sus efectos se produzcan en etapas más tardías y en el día postnatal 2 aún se estén llevando a cabo modificaciones en el remodelado celular que impidan observar los resultados a corto plazo. Por tanto, en este caso, sería necesario evaluar qué sucede con estas anomalías morfológicas hipocampales en estadíos postnatales posteriores en los ratones TS cuyas madres fueron tratadas con curcumina.

Por otro lado, ningún compuesto modificó estos parámetros morfométricos en los animales CO. Esto puede deberse al hecho de que los animales CO ya muestran un área

y volumen adecuado de estas estructuras hipocampales, por tanto pueden existir mecanismos compensatorios que impidan un mayor desarrollo de las mismas.

2.4.2. Efectos sobre la hipocelularidad y la proliferación celular del hipocampo

La reducción del número de neuronas en diferentes áreas del SNC parece comprometer la función cognitiva en el SD y en el ratón TS. Esta hipocelularidad es particularmente importante en el hipocampo debido al papel que juega en el aprendizaje y memoria espacial. Está causada en gran medida por el deterioro generalizado de la neurogénesis, aunque se ve agravada por la posterior hipotrofia del cerebro y por la aparición de diversos procesos que aceleran el envejecimiento cerebral y contribuyen a la neurodegeneración como el estrés oxidativo, la neuroinflamación o el desarrollo de una neuropatología de tipo EA (Bartesaghi et al., 2011; Rueda et al., 2012). Al igual que en estudios anteriores realizados en etapas fetales, en ratones TS neonatos y adultos (Lorenzi y Reeves, 2006; Bianchi et al., 2010; Martínez-Cué et al., 2013; Guidi et al., 2014), en el día postnatal 2, los animales TS mostraron un déficit en la densidad de células granulares maduras y una reducción de progenitores neurales en el DG en comparación con los ratones CO.

Como se detallará en los siguientes apartados, el tratamiento prenatal con los tres compuestos incrementó la neurogénesis hipocampal de los ratones TS.

2.4.2.1. Efectos pro-neurogénicos de la curcumina

La curcumina es una molécula con diversas acciones neuroprotectoras entre las que se encuentra su gran potencial para promover la neurogénesis hipocampal (Kang et al., 2006; Kim et al., 2008; Berberoglu et al., 2009; Tiwari et al., 2014). Aunque la mayor parte de los trabajos publicados hasta ahora han mostrado que la curcumina es capaz de incrementar la neurogénesis en animales adultos (Xu et al., 2007; Kim et al., 2008; Dong et al., 2012; Tiwari et al., 2014), también se ha demostrado que puede estimular la proliferación de las células progenitoras neurales en estadios embrionarios (Kim et al., 2008). De manera consistente, en este estudio, la administración de curcumina a hembras gestantes aumentó significativamente la densidad de células proliferativas en la SGZ de sus crías TS en el día postnatal 2. Este efecto de la curcumina sobre la población

de células que se están dividiendo activamente es probablemente responsable del aumento del área de SGZ en los animales trisómicos.

La administración prenatal de curcumina también aumentó la densidad de células $DAPI^+$ en los animales TS en el día postnatal 2. En este grupo es posible que el aumento de la densidad de nuevas células formadas sea suficiente para producir un incremento significativo en las células granulares maduras y restaurar así la hipocelularidad hipocampal. Sin embargo, otro de los efectos beneficiosos de la curcumina en el proceso de neurogénesis es favorecer la maduración y la diferenciación neuronal. Así, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la curcumina promueve el crecimiento de neuritas, la sinaptogénesis, la migración de células progenitoras neurales, la diferenciación neuronal y la supervivencia (Kang et al., 2006; Liao et al., 2012; Tiwari et al., 2014). Por tanto, la curcumina también podría paliar la hipocelularidad de los animales TS aumentando la maduración y supervivencia celular, favoreciendo que un mayor número de neuronas maduras consigan integrarse en la capa granular del hipocampo. Debido a que el presente estudio se realiza en P2 no es posible hacer una comprobación real del número de células proliferativas que llegan a madurar. Futuros estudios con esta molécula deberán evaluar el fenotipo de las nuevas células generadas, así como la densidad de distintas poblaciones de neuroblastos en diferenciación.

Sin embargo, el hecho de que la curcumina no haya modificado el volumen de DG en los animales TS podría indicar que, aunque este compuesto normaliza la densidad células granulares maduras en cada disector analizado, podría no estar corrigiendo por completo la hipocelularidad puesto que su hipocampo sigue siendo más pequeño y podría no albergar el mismo número de células. Por tanto, al aumentar la densidad de células granulares y no restaurar el volumen de DG, la curcumina podría estar produciendo un aumento del empaquetamiento celular en esta estructura en las crías TS.

La curcumina ejerce sus efectos sobre la neurogénesis hipocampal principalmente a través del aumento de los niveles de BDNF y de los receptores $5HT_{1A}$ (Xu et al., 2007; Nam et al., 2014; Seo et al., 2015). En el ratón TS el tratamiento en etapas postnatales tempranas con fluoxetina también normaliza la proliferación y supervivencia neuronal

mediante el aumento de los niveles de BDNF y de la expresión de receptores $5HT_{1A}$ en el hipocampo en el día P15 (Bianchi et al., 2010) y estos efectos se mantienen en el ratón adulto (Stangni et al., 2015). Por tanto, es posible que la administración prenatal de curcumina también pueda estar incrementando la proliferación y la hipocelularidad hipocampal en las crías TS mediante los mismos mecanismos.

Por otro lado, la curcumina, también mejora la neurogénesis mediante la inducción de la expresión de genes implicados en los procesos de proliferación y diferenciación celular (Dong et al., 2012; Tiwari et al., 2014), reduciendo la gliogénesis y la actividad glial en el hipocampo (Kim et al., 2008; Wang et al., 2013) o ejerciendo neuroprotección mediante sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anti-amiloidogénicas (Frautschy et al., 2001; Estabeyoglu et al., 2012; Darvesh et al., 2012; Dong et al., 2012). Dado que todos estos procesos también están incrementados desde etapas tempranas en el cerebro del ratón TS (Hunter et al., 2004; Lockrow et al. 2009; 2011; Corrales et al., 2013; Trazzi et al., 2013; 2014; Parisotto et al., 2016) e influyen negativamente en los procesos de neurogénesis, sería necesario estudiarlos para poder dilucidar el/los mecanismo/s por los que la administración de curcumina mejorara el proceso neurogénico en los animales TS.

Por último, la administración de curcumina no ejerció ningún efecto sobre la población de células en proliferación en los animales CO. En un trabajo en el que se trató con curcumina a ratas normales de 15 meses de edad se observó que esta molécula aumentaba la proliferación celular tras 12 semanas de tratamiento pero sus efectos no eran tan potentes cuando se administraba solo durante 6 semanas (Dong et al., 2012). Estos autores sugirieron que para promover la proliferación celular se necesita un efecto acumulativo de esta molécula durante largos periodos de tiempo. Por otro lado, existe controversia en cuanto a la dosis de curcumina necesaria para promover la proliferación celular (Xu et al., 2007; Kim et al., 2008). Por tanto, en los animales con una correcta neurogénesis hipocampal, como es el caso de los animales CO de nuestro estudio, es posible que un tratamiento prolongado con curcumina durante la etapa postnatal o una dosis diferente a la administrada en este estudio, pudiera aumentar la densidad de progenitores neurales. Además, el hecho de que en los animales CO, este compuesto haya aumentado la población de células granulares sin modificar la proliferación celular

hipocampal sugiere que, en este grupo, la curcumina parece estar mejorando la neurogénesis actuando preferentemente sobre otras fases de la misma como la diferenciación, maduración y/o supervivencia neuronal más que favoreciendo la proliferación celular en esta región.

2.4.2.2. Efectos pro-neurogénicos del ácido oleico

Tanto la composición de lípidos como el metabolismo de los ácidos grasos en el cerebro son esenciales para el correcto neurodesarrollo. En las personas con SD se han encontrado menores niveles de ácidos grasos monoinsaturados, especialmente de ácido oleico, en los fosfolípidos cerebrales (Shah et al., 1979; Brooksbank y Martínez, 1989). Por ello, se ha propuesto que estas deficiencias podrían jugar un importante papel en las alteraciones del neurodesarrollo y/o las anomalías funcionales que presentan los cerebros de personas con SD (Elul et al., 1975). En el presente estudio, la administración exógena de ácido oleico a hembras TS gestantes ejerció un efecto beneficioso sobre la neurogénesis hipocampal de las crías CO y TS incrementando la densidad de células en división y reduciendo la hipocelularidad de esta estructura. Sin embargo, sus efectos fueron mayores en los animales TS que en los CO. De nuevo, el incremento de la densidad de células en proliferación y de células granulares maduras producido por el tratamiento con ácido oleico en los animales TS podría ser responsable del aumento del área de la SGZ y del volumen del DG respectivamente.

Durante el periodo embrionario, el desarrollo del cerebro está regulado por el ratio alfafetoproteína (AFP)/albúmina que modula los efectos neurotróficos del ácido oleico (García-García et al., 2015). Así, el balance entre estas dos señales, parece ser esencial para inducir la neurogénesis en puntos específicos del desarrollo embrionario, mientras que su desequilibrio contribuye a la aparición de ciertas alteraciones durante el neurodesarrollo. Las personas con SD presentan una reducción tanto en los niveles de AFP como de albúmina en el suero (Nelson, 1961; Voigtlander y Vogel, 1985; Kronquist et al., 1990) que se correlacionan con la menor concentración de ácido oleico en el cerebro (Brooksbank y Martínez, 1989). Por tanto, es posible que tras la administración exógena de ácido oleico durante la etapa prenatal se hayan alcanzado niveles adecuados de este ácido graso y se hayan podido corregir las alteraciones en la neurogénesis

hipocampal de los animales TS. Sin embargo, hasta la fecha no se han estudiado los niveles de AFP, albúmina o ácido oleico cerebrales en este modelo de SD, por lo que futuros estudios deberían determinar sus niveles cerebrales en crías TS y CO tratadas y sin tratar con ácido oleico.

Durante el neurodesarrollo el papel principal del ácido oleico en la neurogénesis es actuar como factor neurotrófico (Medina y Tabernero, 2002; Velasco et al., 2003) promoviendo la diferenciación neuronal (Polo-Hernández et al., 2014). En el caso del SD, estudios previos realizados en cultivos celulares de fetos del ratón Ts16 han demostrado que la sobreexpresión de uno de los genes que están en trisomía en este modelo, en el SD y en el ratón TS, el gen *Dyrk1A*, interfiere con el efecto trófico que ejerce el ácido oleico sobre la diferenciación neuronal (Hijazi et al., 2013). Por tanto, sería necesario realizar estudios que determinen si la administración exógena de ácido oleico también es capaz de paliar las alteraciones que presentan los animales TS en la diferenciación neuronal así como en el crecimiento y desarrollo de axones y de árboles dendríticos de las neuronas hipocampales.

Por otro lado, varios estudios sugieren que el ácido oleico podría jugar un papel esencial en el desarrollo postnatal del cerebro a partir del día postnatal 5, ya que los niveles de GAP43, una proteína inducida por el ácido oleico que participa en la diferenciación neuronal, aumentan en torno al día postnatal 10 (Medina y Tabernero, 2002; Velasco et al., 2003). Por tanto, para poder determinar mejor sus efectos sobre el neurodesarrollo y la neurogénesis del hipocampo de los animales TS sería necesario realizar nuevos estudios en una ventana temporal posterior a P10.

Por último, también se ha demostrado que la administración de ácido oleico ejerce un efecto neuroprotector actuando como antioxidante en el cerebro reduciendo el estrés oxidativo inducido por el ácido 3-nitropropiónico en un modelo de rata con enfermedad de Huntington (Alconchel-Gago et al., 2014). Por tanto, dado que el estrés oxidativo está presente en etapas tempranas del neurodesarrollo en el SD y puede influir negativamente en los procesos de neurogénesis, diferenciación, migración, conectividad sináptica y supervivencia neuronal (Pelsman et al., 2003; Perluigi et al.,

2011), futuros estudios deberían analizar los efectos del ácido oleico sobre el estrés oxidativo cerebral que presentan los ratones TS.

2.4.2.3. Efectos pro-neurogénicos del ácido linolénico

Tanto en animales como en humanos se ha demostrado que durante la gestación y en las primeras etapas de la vida es necesario un aporte adecuado de ácidos grasos de la serie Ω3, como el ácido linolénico, para que se produzca de manera correcta el desarrollo del cerebro y la neurogénesis (Coti-Bertrand et al., 2006; Innis et al., 2008; Janssen y Kiliaan, 2014). La mayor parte de los efectos beneficiosos de los ácidos grasos Ω3 se producen gracias a su conversión en DHA, que no puede sintetizarse por sí solo en el cerebro, sino que proviene de una cascada de desaturaciones y elongaciones cuyo precursor en mamíferos es el ácido linolénico aportado en la dieta. Así, varios estudios demuestran que la administración de una dieta rica en ácido linolénico promueve la neurogénesis hipocampal (Cao et al., 2009; Niculescu et al., 2011; Tang et al., 2016). Por el contrario, la deficiencia de DHA durante la gestación debido a una restricción en la dieta materna de ácidos grasos de la serie Ω3, incluido el ácido linolénico, altera la morfología cerebral (el grosor de diversas capas de la corteza e hipocampo) y la neurogénesis cerebral en embriones de rata (Coti-Bertrand et al., 2006). De manera consistente con estos datos, en este estudio, tras la administración de ácido linolénico durante las etapas prenatales, el incremento en el área de la SGZ y en el volumen de DG se produce en paralelo al aumento de la densidad de células en proliferación y de la densidad de células granulares maduras en esta estructura en el ratón TS.

Coti-Bertrand et al. (2006) sugieren que la inhibición de la neurogénesis tras la restricción, durante las etapas de gestación, de ácidos grasos de la serie Ω3, como el ácido linolénico, parece ser debida a un retraso en la duración del ciclo mitótico o del comienzo de la neurogénesis. En el ratón TS, las alteraciones en la neurogénesis en etapas prenatales también son debidas a una ralentización del ciclo celular (Lorenzi et al., 2006; Contestabile et al., 2007; Bianchi et al., 2010a; 2010b). Por lo que es posible que la administración de ácido linolénico a hembras TS durante la gestación pueda acelerar la velocidad o paliar las alteraciones en el ciclo celular y aumentar el número de progenitores neurales y, por ende, la densidad de células granulares maduras en las

crías TS. Los efectos de la administración de ácido linolénico sobre las alteraciones en el ciclo mitótico de los progenitores neurales deberían ser estudiados en detalle en los animales TS.

El ácido linolénico también incrementa la neurogénesis promoviendo los procesos de diferenciación y maduración celular (Blondeau et al, 2009; Venna et al., 2009; Niculescu et al., 2011). Además, la adición de DHA a cultivos de neuronas primarias sensoriales de rata ejerce un efecto neurotrófico promoviendo el crecimiento de neuritas (Robson et al., 2010). Por ello, futuros estudios también deberán evaluar si la administración prenatal de ácido linolénico promueve la diferenciación neuronal en el ratón TS. En el presente estudio la administración de este ácido graso sí parece ejercer este efecto sobre la diferenciación y maduración neuronal en animales CO, puesto que la administración prenatal de ácido linolénico aumentó su densidad de células granulares sin promover la proliferación celular.

El ácido linolénico ejerce sus efectos pro-neurogénicos no solo en etapas prenatales, sino también en etapas postnatales. Así, la suplementación postnatal de ácido linolénico aumenta la proliferación y la diferenciación celular temprana en el DG de ratón el día postnatal 19 (Niculescu et al., 2011). Sin embargo, sus efectos pro-neurogénicos no están tan claros en etapas adultas. La mayoría de los estudios señalan que el tratamiento subcrónico o crónico con ácido linolénico en ratones adultos aumenta el volumen del hipocampo e incrementa el número de células nacidas, su diferenciación y su supervivencia (Blondeau et al, 2009; Venna et al., 2009). Sin embargo, otros autores no encuentran efectos beneficiosos sobre la diferenciación neuronal en animales de 2 meses de edad que recibieron desde la gestación suplementos de ácidos grasos de la serie Ω3, entre los que se incluyó el ácido linolénico (Janssen et al., 2015). Para clarificar esta controversia, futuros estudios también deberían comprobar si este compuesto sigue ejerciendo efectos pro-neurogénicos en etapas adultas en el ratón TS.

Por último, diversos mecanismos están implicados en el efecto pro-neurogénico del ácido linolénico incluyendo: el aumento de la expresión de BDNF, de la transmisión glutamatérgica, mediante el incremento de la expresión de los transportadores de glutamato VGluT1 y VGluT2, de los niveles de 5HT y de sus receptores $5HT_{1A}$, de la

expresión de genes implicados en los procesos de neurogénesis y de memoria y aprendizaje y de la modificación de la metilación del ADN (Blondeau et al., 2009; Venna et al., 2009; MacNamara et al., 2009; Kim et al., 2011; He et al., 2014; Tang et al., 2016). Dado que en el ratón TS está alterada tanto la transmisión glutamatérgica, como la metilación del ADN o los niveles de BDNF (Rueda et al., 2010; Ramakrishna et al., 2016; Kazim et al., 2017), los efectos pro-neurogénicos encontrados en este estudio tras el tratamiento con ácido linolénico al ratón TS podría estar mediado por uno o varios de estos mecanismos.

Conclusiones

Estudio 1

1. **La reducción de la inhibición mediada por el receptor $GABA_A\alpha5$ mediante la administración de RO4938581 durante 4 ó 12 semanas:**

   1.1. En los animales TS:

   1.1.1. Produjo **efectos pro-cognitivos**, ya que mejoró la memoria espacial de referencia y de trabajo. Además, la administración durante 12 semanas también mejoró el aprendizaje procedimental y la memoria asociativa auditiva.

   1.1.2. Corrigió algunas **alteraciones neuromorfológicas** hipocampales ya que normalizó la densidad de células granulares en el DG e incrementó la proliferación y la diferenciación celular.

   1.1.3. Normalizó el **balance excitador/inhibidor** en la capa molecular del hipocampo disminuyendo el área ocupada por botones sinápticos inhibitorios y aumentando el área ocupada por botones excitadores.

   1.1.4. No modificó la capacidad de atención o la actividad de los animales y tampoco tuvo efectos sobre la ansiedad.

   1.1.5. No alteró las habilidades sensoriales y motoras evaluadas.

   1.1.6. Muchos de los efectos beneficiosos de RO4938581 se mantuvieron 8 semanas después de discontinuar el tratamiento, lo que sugiere que este fármaco ejerce efectos a largo plazo y que, en algunos casos, no es necesario que esté presente en el receptor para producir dichas mejorías en los fenotipos del ratón TS.

   1.2. En los animales CO:

   1.2.1. No tuvo ningún efecto sobre distintos procesos de memoria evaluados.

   1.2.2. No modificó la neurogénesis o el balance excitador/inhibidor hipocampal.

1.2.3. No ejerció ningún efecto sobre la capacidad de atención, la actividad general o los niveles de ansiedad.

1.2.4. No produjo ningún cambio en las habilidades sensoriales y motoras evaluadas.

Estudio 2

2. La administración prenatal del ácido linolénico:

2.1. En las crías TS:

2.1.1. No afectó a la viabilidad, aunque incrementó el número de crías rechazadas por sus madres.

2.1.2. No tuvo efecto sobre el peso corporal o cerebral de los animales.

2.1.3. **Normalizó el volumen de DG** y **el área de la SGZ**.

2.1.4. **Aumentó la proliferación celular** y **normalizó la densidad de células granulares** en el hipocampo.

3. La administración prenatal de ácido oleico

3.1. En las crías TS:

3.1.1. No afectó la viabilidad, aunque incrementó el número de crías rechazadas por las madres.

3.1.2. Normalizó el **peso cerebral** y **corporal**.

3.1.3. **Normalizó el volumen de DG y aumentó el área de la SGZ**.

3.1.4. **Incrementó la proliferación celular**.

4. La administración prenatal de curcumina:

4.1. En las crías TS:

4.1.1. No afectó a la viabilidad, aunque disminuyó el número de abortos.

4.1.2. No tuvo efecto sobre el peso corporal o cerebral.

4.1.3. En el hipocampo, **incrementó el área de la SGZ** pero no recuperó el volumen de DG.

4.1.4. **Aumentó** la **proliferación celular** y **normalizó la densidad de células granulares** en el hipocampo.

5. La administración prenatal de ácido oleico, ácido linolénico o curcumina

5.1. En las crías CO

5.1.1. No ejerció ningún efecto sobre la viabilidad, el peso corporal o cerebral.

5.1.2. No ejerció ningún efecto sobre el área de la SGZ, el volumen de la DG o la proliferación celular en el hipocampo.

5.1.3. **Incrementó la densidad de células granulares en el DG** del hipocampo.

Bibliografía

Ahmed T., Gilani A.H., Hosseinmardi N., Semnanian S., Enam S.A., Fathollahi Y. (2011). Curcuminoids rescue long-term potentiation impaired by amyloid peptide in rat hippocampal slices: Synapse, v.65, p.572-82.

Aït Yahya-Graison E., Aubert J., Dauphinot L., Rivals I., Prieur M., Golfier G., Rossier J., Personnaz L., Creau N., Bléhaut H., Robin S., Delabar J.M., Potier M.C. (2007). Classification of human chromosome 21 gene-expression variations in Down syndrome: impact on disease phenotypes: American Journal of Human Genetics, v.81, p.475-91.

Ak T., Gülçin I. (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin: Chemical biological interaction, v.174, p.27-37.

Alconchel-Gago F., Santamaría A., Isaac Túnez I. (2014). Antioxidant effect of oleic acid and hydroxytyrosol in an experimental model similar to Huntington's disease: Actualidad Medica, v.99, p.60-4, DOI: 10.15568/am.2014.792.or01.

Aldridge K., Reeves R.H., Olson L.E., Richtsmeier J.T. (2007). Differential effects of trisomy on brain shape and volume in related aneuploid mouse models: American Journal of Medical Genetics, v.143, p.1060-70.

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: Neurobiologycal Aging, v. 21, p.511-24.

Antonarakis S.E., Epstein, C.J. (2006). The challenge of Down syndrome: Trends in Molecular Medicine, v.12, p. 473-9.

Antonarakis S.E., Lyle R., Dermitzakis E.T., Reymond A., Deutsch, S. (2004). Chromosome 21 and Down syndrome: from genomics to pathophysiology: Nature Reviews Genetic v.5, p.725-38.

Atack J.R. (2011). GABAA receptor subtype-selective modulators. II. α5-selective inverse agonists for cognition enhancement: Current Topics in Medicinal Chemistry, v.11, p.1203-14.

Atack J.R., Bayley P.J., Seabrook G.R., Wafford K.A., McKernan R.M., Dawson G.R. (2006). L-655,708 enhances cognition in rats but is not proconvulsant at a dose selective for alpha5-containing GABAA receptors: Neuropharmacology, v.51, p.1023-9.

Aylward E.H., Habbak R., Warren A.C., Pulsifer M.B., Barta P.E., Jerram M., and Pearlson G.D. (1997). Cerebellar volume in adults with Down syndrome: Archieves of Neurology, v. 54, p. 209-12.

Baddeley A., Jarrold C. (2007). Working memory and Down syndrome: Journal Intellectual Disability Research, v. 51, p.925-31.

Bahn S., Mimmack M., Ryan M., Caldwell M.A., Jauniaux E., Starkey M., Svendsen C.N., Emson P. (2002). Neuronal target genes of the neuron-restrictive silencer factor in neurospheres derived from fetuses with Down's syndrome: a gene expression study: Lancet, v. 359, p.310-5.

Ballard T.M., Knoflach F., Prinssen E., Borroni E., Vivian J.A., Basile J., Gasser R., Moreau J.L., Wettstein J.G., Buettelmann B., Knust H, Thomas A.W., Trube G., Hernandez M.C. (2009). RO4938581, a novel cognitive enhancer acting at GABAA alpha5 subunit-containing receptors: Psychopharmacology (Berl), v.202, p.207-23.

Bambrick L.L., Yarowsky P.J., Krueger B.K. (2003). Altered astrocyte calcium homeostasis and proliferation in theTs65Dn mouse, a model of Down syndrome: Journal of Neuroscience Research, v. 73, p.89-94.

Banks M.I., Pearce R.A. (2000). Kinetic differences between synaptic and extrasynaptic GABA (A) receptors in CA1 pyramidal cells: Journal of Neuroscience, v.20, p.937-48.

Baraona F., Gurvitz M., Landzberg M.J., Opotowsky A.R. (2013). Hospitalizations and mortality in the United States for adults with Down syndrome and congenital heart disease: Americal Journal Cardiology, v. 111, p.1046-51.

Bartesaghi R, Guidi S, Ciani E. (2011). Is it possible to improve neurodevelopmental abnormalities in Down syndrome? Reviews in Neuroscience, v.22, p.419-55.

Bartus R.T. (2000). On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis: Experimental Neurology, v. 163, p.495-529.

Baxter K.K., Uittenbogaard M., Yoon J., Chiaramello, A. (2009). The neurogenic basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD6 concomitantly increases mitochondrial mass and regulates cytoskeletal organization in the early stages of neuronal differentiation: ASN Neuro, v.1, doi: 10.1042/AN20090036.

Baxter L.L., Moran T.H., Richtsmeier J.T., Troncoso J., Reeves R.H. (2000). Discovery and genetic localization of Down syndrome cerebellar phenotypes using the Ts65Dn mouse: Human Molecular Genetics, v.9, p.195-202.

Beacher F., Daly E., Simmons A., Prasher V., Morris R., Robinson C., Lovestone S., Murphy K., Murphy D.G. (2010). Brain anatomy and ageing in non-demented adults with Down's syndrome: an in vivo MRI study: Psychology Medice, v.40, p.611-9.

Beacher F., Daly, E., Simmons A., Prasher V., Morris R., Robinson C., Lovestone S., Murphy K., Murphy D.G. (2009). Alzheimer's disease and Down's syndrome: an in vivo MRI study: Psychology Medicine, v.39, p.675-84.

Becker L., Mito T., Takashima S., Onodera K. (1991). Growth and development of the brain in Down syndrome: Progress in clinical and biological research, v.373, p.133-52.

Begum, A.N., Jones, M.R., Lim, G.P. (2008). Curcumin Structure-Function, Bioavailability, and Efficacy in Models of Neuroinflammation and Alzheimer's disease: The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, v.396, p.196-208.

Belacchi C., Passolunghi M.C., Brentan E., Dante A., Persi L., Cornoldi C. (2014). Approximate additions and working memory in individuals with Down syndrome. Research in Developmental Disability: v.35, p.1027-35.

Belichenko P.V., Kleschevnikov A.M., Masliah E., Wu C., Takimoto-Kimura R., Salehi A., Mobley W.C. (2009). Excitatory-inhibitory relationship in the fascia dentata in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: Journal of Comparative Neurology, v.512, p.453-66.

Belichenko P.V., Kleschevnikov A.M., Salehi A., Epstein C.J., Mobley W.C. (2007). Synaptic and cognitive abnormalities in mouse models of Down syndrome: exploring genotype-phenotype relationships: Journal of Comparative Neurology, v.504, p.329-45.

Belichenko P.V., Masliah E., Kleschevnikov A.M., Villar A.J., Epstein C.J., Salehi A., Mobley W.C. (2004). Synaptic structural abnormalities in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: Journal of Comparative Neurology, v.480, p.281-98.

Ben-Ari Y. (2002). Excitatory actions of Gaba during development: the nature of the nurture: Nature reviews. Neuroscience, v.3, p.728-39.

Ben-Ari Y., Gaiarsa J. L., Tyzio R., Khazipov R. (2007). GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations: Physiology Reviews, v.87, p.1215-84.

Bento-Abreu A., Velasco A., Polo-Hernández E., Lillo C., Kozyraki R., Tabernero A., Medina J.M. (2009). Albumin endocytosis via megalin in astrocytes is caveola- and Dab-1 dependent and is required for the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid: Journal of neurochemistry, v.111, p.49-60, doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06304.

Bento-Abreu A., Velasco A., Polo-Hernández E., Pérez-Reyes P. L, Tabernero A., Medina J.M. (2008). Megalin is a receptor for albumin in astrocytes and is required for the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid: journal of neurochemistry, v.106, p.1049-59.

Bento-Abreu A., Tabernero A., Medina J.M.(2007). Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha is required for the neurotrophic effect of oleic acid in neurons: Journal of Neurochemical, v.103, p.871-81.

Berberoglu M.A, Dong Z., Mueller T., Guo S. (2009). Fezf2 expression delineates cells with proliferative potential and expressing markers of neural stem cells in the adult zebrafish brain: Gene Expresions Patterns, v.9, p.411-22.

Bhatia H.S., Agrawal R., Sharma S., Huo Y., Ying Z., Gomez-Pinilla F. (2011). Omega-3 Fatty Acid Deficiency during Brain Maturation Reduces Neuronal and Behavioral Plasticity in Adulthood: Plos One, v. 6, doi.org/10.1371/journal.pone.0028451.

Bianchi P., Ciani E., Guidi S., Trazzi S., Felice D., Grossi G., Fernandez M., Giuliani A., Calzà L., Bartesaghi R. (2010b). Early pharmacotherapy restores neurogenesis and cognitive performance in the Ts65Dn mouse model for Down syndrome: Journal of Neuroscience, v.30, p.8769-79.

Bianchi P., Ciani, E., Contestabile A., Guidi S., Bartesaghi R. (2010a). Lithium restores neurogenesis in the subventricular zone of the Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome: Brain Pathology, v.20, p.106-18.

Bimonte-Nelson H.A., Hunter C.L., Nelson M.E., Granholm A.C. (2003). Frontal cortex BDNF levels correlate with working memory in an animal model of Down syndrome: Behavioural Brain Research, v. 139, p.47-57.

Blaesse P., Airaksinen M.S., Rivera C., Kaila K. (2009). Cation-chloride cotransporters and neuronal function: Neuron, v.61, p.820-38.

Bloch M.H., Qawasmi A. (2011). Omega-3 Fatty Acid Supplementation for the Treatment of Children with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptomatology: Systematic Review and Meta-Analysis: Journal of the American Academic of Child and Adolescent Psychiatry, v.50.p.991-1000.

Bloemers B.L., van Bleek G.M., Kimpen J.L., Bont L. (2010). Distinct abnormalities in the innate immune system of children with Down syndrome: Journal Pediatric v. 156, p.804-9.

Botella-López A., Cuchillo-Ibáñez I., Cotrufo T., Mok S.S., Li Q.X., Barquero M.S., Dierssen M., Soriano E., J. Sáez-Valero (2010). Beta-amyloid controls altered Reelin expression and processing in Alzheimer's disease: Neurobiology of Disease, v.37, p.682-91.

Bourin M., Petit-Demoulière B., Dhonnchadha B.N., Hascöet M. (2007). Animal models of anxiety in mice: Fundamental & clinical pharmacology, v.21, p.567-74.

Brickley S.G., Mody I. (2012). Extrasynaptic GABA (A) receptors: their function in the CNS and implications for disease: Neuron, v.73, p.23-34.

Brioni J.D., McGaugh J.L. (1988) Post-training administration of GABAergic antagonists enhances retention of aversively motivated tasks: Psychopharmacology, v.96, p.505-10.

Brooksbank B.W., Martinez M. (1989). Lipid abnormalities in the brain in adult Down's syndrome and Alzheimer's disease: Molecular Chemical Neuropathology, v.11, p. 157-85.

Brugge K., Nichols S., Saitoh T., Trauner D. (1999). Correlations of glutathione peroxidase activity with memory impairment in adults with Down syndrome: Biologycal Psychiatry, v.46, p.1682-89.

Burgos-Morón E., Calderón-Montaño J.M., Salvador J., Robles A., López-Lázaro M. (2010). The dark side of curcumin: International Journal of Cancer, v.126, p. 1771-5.

Busciglio J., Pelsman A., Helguera P., Ashur-Fabian O., Pinhasov A., Brenneman D.E., Gozes I. (2007). NAP and ADNF-9 protect normal and Down's syndrome cortical neurons from oxidative damage and apoptosis. Current Pharmacology Design, v.13, p.1091-8.

Busciglio J., Yankner B.A. (1995). Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro: Nature, v.378, p.776-9.

Bussy G., Charrin E., Brun A., Curie A., Portes V. (2011). Implicit procedural learning in fragile X and Down syndrome: Journal Intellectual Disability Research, v.55, p.521-8.

Butterfield D.A., Pocernich C.B. (2003). The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications: CNS drugs, v.17, p.641-52.

Campolongo p., Roozendaal B., Trezza V., Cuomo V., Astarita G., Jin Fu U., James L., McGaugh B., Piomelli D., (2009). Fat-induced satiety factor oleoylethanolamide enhances memory consolidation: Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, v.106, doi: 10.1073 / pnas.0903038106.

Cao D., Kevala K., Kim J., Moon, H.S, Jun. S.B., Lovinger, D., Kim, H.Y. (2009). Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function Journal of Neurochemistry, v.111, p.510-21.

Capone G., Kim P., Jovanovich S., Payne L., Freund L., Welch K., Miller E., Trush M. (2002). Evidence for increased mitochondrial superoxide production in Down syndrome: Life Science, v.70, p.2885-95.

Capone, G., Kim, P., Jovanovich, S., Payne, L., Freund, L., Welch, K., Miller, E., and Trush, M. (2002). Evidence for increased mitochondrial superoxide production in Down syndrome. Life Sci 70, 2885-95

Caraiscos V.B., Elliott E.M., You-Ten K.E., Cheng V.Y., Belelli D., Newell J.G., Jackson M.F., Lambert J.J., Rosahl T.W., Wafford K.A., MacDonald J.F., Orser B.A. (2004). Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptor: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.101, p.3662-67.

Carlesimo G.A., Marotta L., Vicari S. (1997). Long-term memory in mental retardation: evidence for a specific impairment in subjects with Down's syndrome, v.35, p.71-9.

Carr J., Collins S. (2014). Ageing and dementia in a longitudinal study of a cohort with Down syndrome: Journal of Applied Research in Intellectual Disabilities, v.27, p. 555-63.

Casañas-Sánchez V., Pérez J.A., Fabelo N., Quinto-Alemany, D., Díaz M.L. (2015). Docosahexaenoic (DHA) modulates phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase (Gpx4) gene expression to ensure self-protection from oxidative damage in hippocampal cells: Fronters of Physiology, v.6, doi: 10.3389/fphys.2015.00203.

Cataldo A.M., Mathews P.M., Boiteau A.B., Hassinger L.C., Peterhoff C.M., Jiang, Y., Mullaney K., Neve R.L., Gruenberg J., Nixon R.A. (2008). Down syndrome fibroblast model of Alzheimer-related endosome pathology: accelerated endocytosis promotes late endocytic defects American Journal Pathology, v.173, p.370-84.

Cenini G., Dowling A.L., Beckett T.L., Barone E., Mancuso C., Murphy M.P., Levine H., Lott I.T., Schmitt F.A., Butterfield D.A., Head E. (2012). Association between frontal cortex oxidative damage and beta-amyloid as a function of age in Down syndrome: Biochimica et Biophysica Acta, v.1822, p.130-8.

Chakrabarti L., Best T.K., Cramer N.P., Carney R.S., Isaac J.T., Galdzicki Z., and Haydar T.F. (2010). Olig1 and Olig2 triplication causes developmental brain defects in Down syndrome: Nature Neuroscience, v.13, p.927-34.

Chakrabarti L., Galdzicki Z., Haydar T.F. (2007). Defects in embryonic neurogenesis and initial synapse formation in the forebrain of the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: Journa of Neuroscience, v.27, p.11483-95.

Chan J.R., Cosgaya M., Wu Y.J., Shooter E.M. (2001). Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system: Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, V.98, p.390-4.

Chang Q., Gold P.E. (2007). Age-related changes in memory and in acetylcholine functions in the hippocampus in the Ts65Dn mouse, a model of Down syndrome: Neurobiology Learning and Memory, v.89, p.177-87.

Chapman R.S. (2006). Language learning in Down syndrome: the speech and language profile compared to adolescents with cognitive impairment of unknown origin: Downs Syndrome Research Practice, v. 10, p.61-6.

Chapman R.S., Seung H.K., Schwartz S.E., Bird E.K. (2000). Predicting language production in children and adolescents with Down syndrome: the role of comprehension. Journal Speech Lang Hear Research: v. 43, p.340-50.

Chatterjee A., Dutta S., Mukherjee S., Mukherjee N., Dutta A., Mukherjee A., Sinha S., Panda CK., Chaudhuri K., Roy AL., Mukhopadhyay K. (2013). Potential contribution of SIM2 and ETS2 functional polymorphisms in Down syndrome associated malignancies: BMC Medical Genetics, v.14, DOI: 10.1186 / 1471-2350-14-12.

Chen C.C., Hsieh M.S., Hsuuw Y.D., Huang F.J., Chan W.H. (2010). Hazardous Effects of Curcumin on Mouse Embryonic Development through a Mitochondria-Dependent Apoptotic Signaling Pathway: International Journal Molecular Science, v.11, doi: 10.3390/ijms11082839.

Chen H. F., Su H.M. (2013). Exposure to a maternal n-3 fatty acid-deficient diet during brain development provokes excessive hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to stress and behavioral indices of depression and anxiety in male rat offspring later in life: Nutricion and Biochemical, v. 24, p.70-80. doi: 10.1016 / j. jnutbio.2012.02.006

Chen J.Y., Lin J.R., Tsai F.C., Meyer T. (2013). Dosage of Dyrk1a shifts cells within a p21-cyclin D1 signaling map to control the decision to enter the cell cycle: Molecular Cell, v. 52, p. 87-100.

Cheng YF., Guo L., Xie YS., Liu YS, Zhang J., Wu QW, Li JM. (2013). Curcumin rescues aging-related loss of hippocampal synapse input specificity of long-term potentiation in mice: Neurochemical research, v.38, p.98-107.

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: Experimental Neurology, v.200, p.256-61.

Clarke M.S., Prendergast M.A., Terry A.V Jr. (1999). Plasma membrane ordering agent pluronic F-68 (PF-68) reduces neurotransmitter uptake and release and produces learning and memory deficits in rats: Learning and memory, v.6, p.634-49.

Clarke C.S., Bannon F.J. (2005). Serum albumin in Down syndrome with and without Alzheimer's disease. Journal Medical Science, v.174, p.4-8.

Colas D., Chuluun B., Warrier D., Blank M., Wetmore D.Z., Buckmaster P., Garner C.C., Heller H.C. (2013). Short-term treatment with the GABAA receptor antagonist pentylenetetrazole produces a sustained pro-cognitive benefit in a mouse model of Down's syndrome: British Journal of Pharmacology, v.169, p.963-73.

Cole S.O. (1986). Effects of benzodiazepines on acquisition and performance: a critical assessment: Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.10, p.265-72.

Collinson N., Kuenzi F.M., Jarolimek W., Maubach K.A., Cothliff R., Sur C., Smith A., Otu F.M., Howell O., Atack J.R., McKernan R.M., Seabrook G.R., Dawson G.R., Whiting P.J., Rosahl T.W. (2002). Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha 5 subunits of the GABAA receptor: Journal of Neuroscience, v.22, p.5572-80.

Contestabile A., Ciani E. (2008). The place of choline acetyltransferase activity measurement in the "cholinergic hypothesis" of neurodegenerative diseases: Neurochemical Research, v.33, p.318-27.

Contestabile A., Fila T., Bartesaghi R., Ciani E. (2009a). Cell cycle elongation impairs proliferation of cerebellar granule cell precursors in the Ts65Dn mouse, an animal model for Down syndrome: Brain Pathology, v.19, p.224-37.

Contestabile A., Fila T., Cappellini A., Bartesaghi R., Ciani E. (2009b). Widespread impairment of cell proliferation in the neonate Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome: Cell Proliferation, v.42, p.171-81.

Contestabile A., Fila T., Ceccarelli C., Bonasoni P., Bonapace L., Santini D., Bartesaghi R., Ciani E. (2007). Cell cycle alteration and decreased cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus and in the neocortical germinal matrix of fetuses with Down syndrome and in Ts65Dn mice: Hippocampus, v.17, p.665-78.

Cooper A., Grigoryan G., Guy-David L., Tsoory M. M., Chen A., & Reuveny E. (2012). Trisomy of the G protein-coupled K+ channel gene, Kcnj6, affects reward mechanisms, cognitive functions, and synaptic plasticity in mice: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.109, p. 2642-7.

Cooper J.D., Salehi A., Delcroix J.D., Howe C.L., Belichenko P.V., Chua-Couzens J., Kilbridge J.F., Carlson E.J., Epstein C.J., Mobley W.C. (2001). Failed retrograde transport of NGF in a mouse model of Down's syndrome: reversal of cholinergic neurodegenerative phenotypes following NGF infusion: Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, v.98, doi: 10.1073 / pnas.181219298.

Cortes Romero C., Galindo F., Galicia-Isasmendi S., Flores A. (2011). GABA: a functional duality? Transition during neurodevelopment: Journal of neurology, v.52, p.665-75.

Costa A.C., Walsh K., Davisson M.T. (1999). Motor dysfunction in a mouse model for Down syndrome: Physiology and Behavior, v.68, p.211-20.

Costa de CA., Scott-McKean J.J., Stasko MR. (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, v.33, p. 1624-32.

Coti B., O'Kusky J.R., Innis S.M. (2006). Maternal dietary (n-3) fatty acid deficiency alters neurogenesis in the embryonic rat brain: the journal of nutricion, v.136, and p.1570-5.

Coussons-Read M.E., Crnic L.S. (1996). Behavioral assessment of the Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome: altered behavior in the elevated plus maze and open field: Behavior Genetics, v.26, p.7-13.

Coyle J.T., Oster-Granite M.L., Reeves R.H., Gearhart J.D. (1988). Down syndrome, Alzheimer's disease and the trisomy 16 mouse: Trends in neurosciences, v.11, p.390-4.

Cramer N.P., Xu X., F Haydar T., Galdzicki Z. (2015). Altered intrinsic and network properties of neocortical neurons in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: Physiological Reports, doi: 10.14814/phy2.12655.

Cramer N., Galdzicki, Z. (2012). From abnormal hippocampal synaptic plasticity in Down syndrome mouse models to cognitive disability in Down syndrome: Neural Plasticity, doi: 10.1155/2012/101542.

Crawley J.N. (2004). Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors: Mental retardation and developmental disabilities research reviews, v.10, p.248-58.

Crestani F., Keist R., Fritschy J.M., Benke D., Vogt K., PrutL., Blüthmann H., Möhler H., Rudolph U. (2002). Trace fear conditioning involves hippocampal alpha5 GABA (A) receptors: Proceedings of the National Academy of Sciences U S A, v.99, p.8980-5.

Crnic L.S., Pennington B.F. (2000). Down síndrome: neurophychology and animals models: In Progress in Infancy Research, p.69-111.

Cutuli D. (2016). Functional and structural benefits induced by omega-3 polyunsaturated fatty acids during aging: Current Neuropharmacology, v.14, doi: 10.2174/ 1570159X14666160614091311.

Cutuli D., Pagani, M., Caporali P., Galbusera A., Laricchiuta D., Foti F., Neri C., Spalletta G., Caltagirone C., Petrosini L., Gozzi A. (2016). Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation on Cognitive Functions and Neural Substrates: A Voxel-Based Morphometry Study in Aged Mice: Fronters of Aging Neuroscince, v.8, doi: 10.3389/fnagi.2016.00038.

Dang H.Z., Li R.S., Wang H., Ren Y., Sun H.Y., Yang J.D., Wang P.W. (2013). Effect of curcumin on expression of AKT and p-AKT in hippocampus CA1 area of App/PS1 double transgenic mice: Journal Chinesse medical, v.38, p. 3327-31.

Darvesh A.S., Carroll R.T., Bishayee A., Novotny N. A, Geldenhuy, W. J, Van der Schyf C.J. (2012). Curcumin and neurodegenerative diseases: a perspective: Expert Opinion on Investigational Drugs, v.21, p.1123-40.

Darvesh AS., Carroll RT., Bishayee A., Geldenhyus WJ., Van der Schyf CJ. (2010). Oxidative stress and Alzheimer's disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents: Experts Revision Neurotherapeutics, v.10, p729-45.

Dauphinot L., Lyle R., Rivals I., Dang M.T., Moldrich R.X., Golfier G., Ettwiller L., Toyama K., Rossier J., Personnaz L., Antonarakis SE., Epstein CJ., Sinet PM., Potier MC., (2005). The cerebellar transcriptome during postnatal development of the Ts1Cje mouse, a segmental triso Kahlem P., Sultan M., Herwig R., Steinfath M., Balzereit D., Eppens B., Saran N.G., Pletcher M.T., South S.T., Stetten G., Lehrach H., Reeves R.H., Yaspo M.L. (2004). Transcript level alterations reflect gene dosage effects across multiple tissues in a mouse model of Down syndrome: Genome Research, v.14, p.1258-67.my model for Down syndrome: Human Molecular Genetics, v.14, p.373-84.

Davisson M.T., Schmidt C., Reeves R.H., Irving N.G., Akeson E.C., Harris B.S., Bronson R.T. (1993). Segmental trisomy as a mouse model for Down syndrome: Progress in clinical and biological research, v.384, p.117-33.

Dean C., Liu H., Dunning F.M., Chang P.Y., Jackson M.B., Chapman E. R. (2009). Synaptotagmin-IV modulates synaptic function and long-term potentiation by regulating BDNF release: Nature Neuroscience, v.12, p.767-76.

Deidda G., Bozarth I.F., Cancedda L. (2014). Modulation of GABAergic transmission in development and neurodevelopmental disorders: investigating physiology and pathology to gain therapeutic perspectives: Frontiers in cellular neuroscience, v.8, p.119.

Deinhardt K., Chao M.V. (2014). Trk receptors: Handbook Experimental Pharmacology, v.220, p.103-19, doi: 10.1007/978-3-642-45106-5_5.

Delabar J.M., Aflalo-Rattenbac R., Créau N. (2006). Developmental defects in trisomy 21 and mouse models: ScientificWorldJournal, v.6, p.1945-64.

Delabar J.M., Theophile D., Rahmani Z., Chettouh Z., Blouin J.L., Prieur M., Noel B., Sinet P.M. (1993). Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21: Human Genetic, v.1, p.114-124.

Demas G.E., Nelson R.J., Krueger B.K., Yarowsky P.J. (1996). Spatial memory deficits in segmental trisomic Ts65Dn mice: Behavioural Brain Research, v.82, p.85-92.

Di Domenico F., Coccia R., Cocciolo A., Murphy M.P., Cenini G., Head E., Butterfield D.A., Giorgi, A., Schinina M.E., MancusoC., Cini C., Perluigi M. (2013). Impairment of proteostasis network in Down syndrome prior to the development of Alzheimer's disease neuropathology: redox proteomics analysis of human brain: Biochimica et Biophysica Acta, v.1832, p.1249-59.

Di Martino R.M., Luppi B., Bisi., Gobbi S., Rampa A., Abruzzo A., Belluti F. (2017) Recent progress on curcumin-based therapeutics: a patent review (2012-2016): Expert Opinion on Therapeutic Patents, doi: 10.1080/13543776.2017.1276566.

Dickson P.E., Rogers T.D., Del Mar N., Martin L.A., Heck D., Blaha C.D., Goldowitz D., Mittleman G. (2010). Behavioral flexibility in a mouse model of developmental cerebellar Purkinje cell loss: Neurobiology Learning and Memory, v. 94, 220-8.

Dierssen M. (2012). Down syndrome: the brain in trisomic mode: Nature Reviews Neuroscience, v.13, p.844-58.

Dierssen M., Benavides-Piccione R., Martínez-Cué C., Estivill X., Flórez J., Elston G.N., DeFelipe J. (2003). Alterations of neocortical pyramidal cell phenotype in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: effects of environmental enrichment: Cerebral Cortex, v.13, p.758-64.

Dierssen M., Herault Y., and Estivill X. (2009). Aneuploidy: from a physiological mechanism of variance to Down syndrome: Physiological Reviews, v.89, p.887-20.

Dierssen M., Lagrán M.M. (2006). DYRK1A (dual-specificity tyrosine-phosphorylated and -regulated kinase 1A): a gene with dosage effect during development and neurogenesis. ScientificWorld Journal: v.6, p.1911-22.

Diomede L., Salmona M., Albani D., Bianchi M., Bruno A., Salmona S., Nicolini U. (1999). Alteration of SREBP activation in liver of trisomy 21 fetuses: Biochemical and Biophysical Research Communications, v.260, p.499-503.

Dogliotti G., Galliera E., Dozio E., Vianello E., Villa R.E., Licastro F., Barajon I., Corsi M.M. (2010). Okadaic acid induces apoptosis in Down syndrome fibroblasts: Toxicological in Vitro, v.24, p.815-21.

Dong S., Zeng Q., Mitchell, E.S., Xiu J., Duan Y., Li C., Tiwari J.K., Hu Y., Cao X., Zhao, Z. (2012). Curcumin enhances neurogenesis and cognition in aged rats: implications for transcriptional interactions related to growth and synaptic plasticity: PloS One, v.7, doi: 10.1371/journal.pone.0031211.

Dowdy-Sanders, N.C., Wenger. G-R. (2006). Working memory in the Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome. Behavior Brain Research, v.168, p.349-52.

Driscoll L.L., Carroll J.C., Moon J., Crnic L.S., Levitsky D.A., Strupp B.J. (2004). Impaired sustained attention and error-induced stereotypy in the aged Ts65Dn mouse: a mouse model of Down syndrome and Alzheimer's disease: Behavioral Neuroscience, v.118, p.1196-205.

Duchon A., 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, v.22, p.674-84.

Duman R.S., Nakagawa S., Malberg J. (2001). Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment: Neuropsychopharmacology, v.25, p.836-44.

Dzhala V. I., Talos D. M., Sdrulla D. A., Brumback A. C., Mathews G. C., Benke T. A., et al. (2005). NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. Nature Medicine, v.11, p.1205-13. Mohler H., Fritschy J.M., Lüscher B., Rudolph U., Benson J., and Benke D. (1996). The GABAA receptors. From subunits to diverse functions: Ion Channels, v.4, p.89-113.

Dziegielewska K.M., Evans C.A., Lai P.C., Lorscheider F.L., Malinowska D.H., Møllgård K., Saunders N.R. (1981). Proteins in cerebrospinal fluid and plasma of fetal rats during development: Development of Biology, v.83, p.183-200.

Earnheart J.C., Schweizer C., Crestani F., Iwasato T., Itohara S., Mohler H., Lüscher B. (2007). GABAergic control of adult hippocampal neurogenesis in relation to behavior indicative of trait anxiety and depression states: Journal of Neuroscience, v.27, p.3845-54.

Edgin J. O., Mason G. M., Allman M. J., Capone G. T., Deleon I., Maslen C., Reeves R. H., Sherman S. L., Nadel L. (2010). Development and validation of the Arizona Cognitive Test Battery for Down syndrome. Journal Neurodevelopmental Disorder, v.2, p.149-64.

Elton T.S., Sansom S.E., Martin M.M. (2010). Trisomy-21 gene dosage over-expression of miRNAs results in the haploinsufficiency of specific target proteins: RNA Biology, v.7, p.540-7.

Elul R., Hanley J., Simmons I.I., J.Q. (1975). Non-Gaussian behavior of the EEG in Down's syndrome suggests decreased neuronal connections: Acta Neurology Scand. v.51, p.21-8

Encinas J.M., Vaahtokari A., Enikolopov G. (2006). Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain: Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, v.103, p.8233-8.

Engidawork E., Lubec G. (2003). Molecular changes in fetal Down syndrome brain: Journal of Neurochemical, v. 84, p.895-904.

Enríquez Zarabozo E., Blesa Sánchez E., Ayuso Velasco R., Galán Gómez E. (2010). Digestive malformations and their associations to syndrome condition and genetic defects: Surgery Pediatric v.23, p.46-52.

Escorihuela R.M., Fernandez-Teruel A., Vallina I.F., Baamonde C., Lumbreras M.A., Dierssen M., Tobena A., Florez J. (1995). A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model: Neuroscience Letters, v.199, p.143-6.

Escorihuela R.M., Vallina, I.F., Martínez-Cué C., Baamonde, C., Dierssen M., Tobeña, A., Flórez J., Fernández-Teruel, A. (1998). Impaired short- and long-term memory in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome: Neuroscience Letters, v. 247, p.171-4.

Esposito G., Imitola J., Lu J., De Filippis D., Scuderi C., Ganesh V.S., Folkerth R., Hecht J., Shin S., Iuvone T., Chesnut J., Steardo L., Sheen V. (2008). Genomic and functional profiling of human Down syndrome neural progenitors implicates S100B and aquaporin 4 in cell injury: Human Molecular Genetic, v.17, p.440-57.

Estabeyoglu T., Huebbe P., Ernst I.M.A., Chin D, Wagner A.E., Rimbach G. (2012). Curcumin-From molecule to biological function: Angew Review Interntionl, v.51, p.5308-32.

Ferguson G.D., Wan, H., Herschman H.R., Storm, D.R. (2004). Altered hippocampal short-term plasticity and associative memory in synaptotagmin IV (-/-) mice: Hippocampus, v.14, p.964-74.

Fernandez F., Morishita W., Zuniga E., Nguyen J., Blank M., Malenka R.C., Garner C.C. (2007). Pharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of Down syndrome: Nature Neuroscience, v.10, p.411-3.

Fernández-Bachiller M.I., Pérez C., Campillo N.E., Páez J.A., González-Muñoz G.C., Usán P., García-Palomero E., López, M.G., Villarroya M., García A.G., Martínez A., Rodríguez-Franco M.I. (2009). Tacrine-melatonin hybrids as multifunctional agents for Alzheimer's disease, with cholinergic, antioxidant, and neuroprotective properties. ChemMedChem, v.4, p. 828-41.

Ferrer I., Gullotta F. (1990). Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus: Acta Neuropathology, v. 79, p.680-5.

Flórez J. (1999). Patología cerebral y sus repercusiones cognitivas en el síndrome de Down. Siglo Cero: v.30, p.29-45.

Floréz J., Garvía R., Férnandez-Olaria. (2015). Síndrome de Down: Neurobiología, neuropsiología, Salud mental: Bases para la intervención en el aprendizaje, la conducta y el bienestar menal. Editorial CEPE, Madrid, España, 2015.

Fox N.C., Crum W.R., Scahill R.I., Stevens J.M., Janssen J.C., Rossor M.N. (2001). Imaging of onset and progression of Alzheimer's disease with voxel-compression mapping of serial magnetic resonance images: Lancet, v.358, p.201-5.

Frautschy S.A., Hu W., Kim P., Miller S.A., Chu T., Harris-White M.E., Cole G.M. (2001). Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of Abeta-induced cognitive deficits and neuropathology: Neurobiology Aging, v.22, p.993-1005.

Freund T.F., Buzsaki G. (1996). Interneurons of the hippocampus: Hippocampus, v.6, p.347-470.

Fritschy J.M., Panzanelli P. (2014). GABAA receptors and plasticity of inhibitory neurotransmission in the central nervous system: The European journal of neuroscience, v.39, p.1845-65.

Fujita S., Ikegaya Y., Nishikawa M., Nishiyama N., Matsuki N. (2001). Docosahexaenoic acid improves long-term potentiation attenuated by phospholipase A inhibitor in rat hippocampal slices: British journal of pharmacology, v.132, p.417-22.

Fukuda Y., Berry T.L., Nelson M., Hunter C.L., Fukuhara K., Imai H., Ito S., Granholm-Bentley A.C., Kaplan A.P., Mutoh T. (2010). Stimulated neuronal expression of brain-derived neurotrophic factor by Neurotropin: Molecular and Cellular Neuroscience, v.45, p.226-33.

Furuta A., Price D.L., Pardo C.A., Troncoso J.C., Xu Z.S., Taniguchi N., Martin L.J. (1995). Localization of superoxide dismutases in Alzheimer's disease and Down's syndrome neocortex and hippocampus: American Journal Pathology, v.146, p.357-67.

Gaete M.G., Atalah S.E., Araya J. (2002). Efecto de la suplementación de la dieta de la madre durante la lactancia con ácidos grasos omega 3 en la composición de los lípidos de la leche: revista chilena pediatríca, v.73, p.239-47.

Galdzicki Z., Siarey, R., Pearce R., Stoll, J., Rapoport S.I. (2001). On the cause of mental retardation in Down syndrome: extrapolation from full and segmental trisomy 16 mouse models. Brain Research review, v.35, p.115-45.

Galeote M., Soto, P., Sebastián E., Checa E., Sánchez-Palacios C. (2014). Early grammatical development in Spanish children with Down syndrome: Journal Children Lang, v.41, p.111-31.

Gamis A.S., Smith, F.O. (2012). Transient myeloproliferative disorder in children with Down syndrome: clarity to this enigmatic disorder: British Journal of Haematology, v.159, p.277-87.

Gandhi, C.C., Kelly, R.M., Wiley, R.G., Walsh, T.J. (2000). Impaired acquisition of a Morris water maze task following selective destruction of cerebellar purkinje cells with OX7-saporin: Behaviour Brain Research, v.109, p.37-47.

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: Journal Neurologycal Science, v.51, p.43-50.

Ganiger S., Malleshappa H.N., Krishnappa H., Geetha Rajashekhar V., Ramakrishna, R., Sullivan F. (2007). A two-generation reproductive toxicity study with curcumin, turmeric yellow, in Wistar rats: Food and Chemical Toxicology, v.45, p.64-9.

García-Cerro S., Martínez P., Vidal V., Corrales A., Flórez J., Vidal R., Rueda N., Arbonés ML., Martínez-Cué C. (2014). Overexpression of Dyrk1A is implicated in several cognitive, electrophysiological and neuromorphological alterations found in a mouse model of Down syndrome: PloS one, v.9, p.1065-72.

García-García A.G., Polo-Hernández E., Tabernero A., Medina J.M. (2015). Alpha-fetoprotein (AFP) modulates the effect of serum albumin on brain development by restraining the neurotrophic effect of oleic acid: Brain research, v.1624, doi: 10.1016/j.brainres.2015.07.021.

Ge S., Goh, E.L., Sailor K.A., Kitabatake Y., Ming G.L., Song H. (2006). GABA regulates synaptic integrati Fritschy J.M., Panzanelli P. (2014). GABAA receptors and plasticity of inhibitory neurotransmission in the central nervous system: The European journal of neuroscience, v.39, p.1845-65. on of newly generated neurons in the adult brain: Nature, v.439, p.589-93.

Ge S., Pradhan D.A., Ming G.L., Song H. (2007). GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogénesis: Trends in neurosciences, v.30, p.1-8.

Ghoneim M.M., Mewaldt S.P. (1990). Benzodiazepines and human memory: a review: Anesthesiology, v.72, p.926-38.

Gil-Sánchez A., Koletzko B., Larqué E. (2012) Current understanding of placental fatty acid transport: Current Opinion Clinical Nutricional Metabolic Care, v.15, doi: 10.1097/MCO.0b013e3283523b6e.

Glykys J., Mann E.O., Mody I. (2008). Which GABA (A) receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? Journal of Neuroscience, v.28, p.1421-26.

Glykys J., Mody I. (2006). Hippocampal network hyperactivity after selective reduction of tonic inhibition in GABA A receptor alpha5 subunit-deficient mice: Journal of neurophysiology, v.95, p.2796-807.

Godridge H., Reynolds G.P., Czudek C., Calcutt N.A., Benton M. (1987). Alzheimer-like neurotransmitter deficits in adult Down's syndrome brain tissue: Journal of Neurologycal Neurosurge Psychiatryc, v.50, p.77-83.

Golden J.A., Hyman B.T. (1994). Development of the superior temporal neocortex is anomalous in trisomy 21. Journal Neuropathology Experimental Neurology, v.53, p.513-20.

Graber E., Chacko E., Regelmann M.O., Costin G., Rapaport R. (2012). Down syndrome and thyroid function: Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, v. 41, p.735-45.

Granda B., Tabernero A., Tello V., Medina M. (2003). Oleic acid induces GAP-43expression through a protein kinase C-mediated mechanism that is independent of NGF but synergistic with NT-3 and NT-4/5: Brain research, v.988, p.1-8.

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 síndrome: Experimental Neurology, v.161, p.647-63.

Griffin W.S., Stanley L.C., Ling C., White L., MacLeod V., Perrot L.J., White C.L., Araoz C. (1989). Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, v.86, p.7611-15.

Guedj F., Sébrié C., Rivals I., Ledru A., Paly E., Bizot J.C., Smith D., Rubin E., Gillet B., Arbones M., Delabar J.M. (2009). Green tea polyphenols rescue of brain defects induced by overexpression of DYRK1A: Plos One, v.4, doi: 10.1371 / journal. pone.0004606.

Guidi S., Bonasoni P., Ceccarelli C., Santini D., Gualtieri F., Ciani E., Bartesaghi R. (2008). Neurogenesis impairment and increased cell death reduce total neuron number in the hippocampal region of fetuses with Down syndrome: Brain pathology, v.18, p.180-97.

Guidi S., Ciani, E., Bonasoni P., Santini D., and Bartesaghi R. (2011). Widespread proliferation impairment and hypocellularity in the cerebellum of fetuses with Down syndrome. Brain Pathologycal, v. 21, p. 361-73.

Guidi S., Stagni F., Bianchi P., Ciani E., Giacomini A., De Franceschi M., Moldrich R., Kurniawan N., Mardon K., Giuliani A., Calzà L., Bartesaghi R. (2014). Prenatal pharmacotherapy rescues brain development in a Down's syndrome mouse model: Brain, v.137, p.380-401.

Guihard-Costa A.M., Khung S., Delbecque K., Ménez F., Delezoide A.L. (2006). Biometry of face and brain in fetuses with trisomy 21: Pediatric Research v.59, p.33-8.

Guimera, J., Casas, C., Estivill, X., and Pritchard, M. (1999). Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome: Genomics, v.57, p.407-18.

Gulesserian T., Engidawork E., Yoo B.C., Cairns N., Lubec G. (2001). Alteration of caspases and other apoptosis regulatory proteins in Down syndrome. Journal Neural Transmission Supplementum, v.61, p.163-79.

Guo J.P., Yu S., McGeer P.L. (2010). Simple in Vitro Assays to Identify Amyloid-β Aggregation Blockers for Alzheimer's Disease Therapy: Journal Alzheimer disease, v.19, p. 1359-70. doi: 10.3233 / JAD- 2010 -1331.

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: Journal of Neuroscience v. 17, p.2277-86.

Hanslmayr S., Matuschek J., Fellner M.C. (2014). Entrainment of prefrontal beta oscillations induces an endogenous echo and impairs memory formation: Current Biology, v.24, p. 904-09.

Hanson J.E., Blank M., Valenzuela R.A., Garner C.C., and Madison, D.V. (2007). The functional nature of synaptic circuitry is altered in area CA3 of the hippocampus in a mouse model of Down's syndrome. Journal of Physiology, v. 579, p.53-67.

Harkany T., Abrahám I., Timmerman W., Laskay G., Tóth B., Sasvári M., Kónya C., Sebens J.B., Korf J., Nyakas C., Zarándi M., Soós K., Penke B., Luiten P.G. (2000). A glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis mediates beta-amyloid neurotoxicity: The European journal of neuroscience, v.12, p.2735-45.

Hashimoto M., Hossain S., Al Mamun A., Matsuzaki K., Arai H.(2016). Docosahexaenoic acid: one molecule diverse functions: Critical Reviews in Biotechnology, doi: 10.1080/07388551.2016.1207153.

Hashimoto M., Shahdat H., Osamu S. (2006). Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid withstands dietary cholesterol-induced decreases in platelet membrane fluidity: Molecular and Cellular Biochemistry, v.293, p.1-8.

Hashimotoa M., Hossaina S., Katakuraa M., Mamuna A.A., Shidoa O. (2015). The binding of Aβ1–42 to lipid rafts of RBC is enhanced by dietary docosahexaenoic acid in rats: implicates to Alzheimer's disease: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes, v.1848, p.1402-9.

Hattori M., Fujiyama A., Taylor T.D., Watanabe H., Yada T., Park H.S., Toyoda A., Ishii K., Totoki Y., Choi D.K., Groner Y., Soeda E., Ohki M., Takagi T., Sakaki Y., Taudien S., Blechschmidt K., Polley A., Menzel U., Delabar J., Kumpf K., Lehmann R., Patterson D., Reichwald K., Rump A., Schillhabel M., Schudy A., Zimmermann W., Rosenthal A., Kudoh J., Schibuya K., Kawasaki K., Asakawa S., Shintani A., Sasaki T., Nagamine K., Mitsuyama S., Antonarakis S.E., Minoshima S., Shimizu N., Nordsiek G., Hornischer K., Brant P., Scharfe M., Schon O., Desario A., Reichelt J., Kauer G., Blocker H., Ramser J., Beck A., Klages S., Hennig S., Riesselmann L., Dagand E., Haaf T., Wehrmeyer S., Borzym K., Gardiner K., Nizetic D., Francis F., Lehrach H., Reinhardt R., Yaspo M.L.(2000). Chromosome 21 mapping and sequencing consortium, The DNA sequence of human chromosome 21: Nature, v.405, p.311-19.

Hawli Y., Nasrallah M., El-Hajj Fuleihan G. (2009). Endocrine and musculoskeletal abnormalities in patients with Down syndrome: Nature Review Endocrinology, v. 5, p.327-34.

He X.J., Xiao Y., Zhang Q., Ma L.P., Li N., Yang J. (2013). Detection and functional annotation of misregulated microRNAs in the brain of the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. Chinese Medical Journal (Engl): v.126, p.108-113.

He F., Lupu D.S., Niculescu MD.(2014).Perinatal α-linolenic acid availability alters the expression of genes related to memory and to epigenetic machinery, and the Mecp2 DNA methylation in the whole brain of mouse offspring: International Journal of Developmental Neuroscience, v.36, p.38-44, doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.05.006.

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: Journal of Neuroscience, v. 25, p. 2295-303.

Hijazi M., Fillat C., Medina J.M., Velasco A. (2013). Overexpression of DYRK1A inhibits choline acetyltransferase induction by oleic acid in cellular models of Down syndrome: Experimental neurology, v.239, p.229-234.

Hijazi M., Velasco A., Medina J.M. (2017). Restrained Phosphatidylcholine Synthesis in a Cellular Model of Down's syndrome is associated with the Overexpression of Dyrk1A: Molecular neurobiology, v.54, p.1092-1100.

Holtzman D.M., Santucci D., Kilbridge J., Chua-Couzens J., Fontana D.J., Daniels S.E., Johnson R.M., Chen K., Sun Y., Carlson E., Alleva E., Epstein C.J., Mobley W.C. (1996). Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome: Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A., v.93, p.13333-38.

Hossain S., Hashimoto M., Gamoh S., Masumura S. (1999). Antioxidative Effects of Docosahexaenoic Acid in the Cerebrum Versus Cerebellum and Brainstem of Aged Hypercholesterolemic Rats: Journal of neurochemistry, v.72, doi:10.1046/j.1471-4159.1999.0721133. x.

Hsiang Y.H., Berkovitz G.D., Bland G.L., Migeon C.J., Warren A.C. (1987). Gonadal function in patients with Down syndrome: Am Journal Medical Genetic, v. 27, p.449-58.

Huang E.J., Reichard L.F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction: Annual review of biochemistry, v.72, p.609-42.

Huang F.J., Lan K.C., Kang H.Y., Liu Y.C., Hsuuw Y.D, Chan W.H, Huang K.E. (2013) Effect of curcumin on in vitro early post-implantation stages of mouse embryo development: European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, v.166, p.47-71.

Huang H., L Liu., Li B., Zhao P.P., Xu C.M., Zhu Y.Z., Zhou C.H., Wu Y.Q. (2015). Ketamine interferes with the proliferation and differentiation of neural stem cells in the subventricular zone of neonatal. Cell Physiol Biochem, v. 35, p.315-325. doi: 10.1159 / 000369698.

Huang, Z., Xiao-Ming, Z., Zhao-Yi, L., Chun-Rong, F., Ai-Juan, P., Qing-Qiu, M. (2011). Curcumin reverses corticosterone-induced depressive-like behavior and decrease in brain BDNF levels in rats: Neuroscience Letters, v.493,p.145-8.

Hunter C.L., Bachman D., Granholm A.C. (2004). Minocycline prevents cholinergic loss in a mouse model of Down's syndrome: Annals of Neurology, v.56, p.675-88.

Hunter C.L., Bimonte H.A., Granholm A.C. (2003). Behavioral comparison of 4 and 6 month-old Ts65Dn mice: age-related impairments in working and reference memory: Behavioural Brain Research, v. 138, p.121-31.

Hyde L.A., Crnic, L.S. (2001). Age-related deficits in context discrimination learning in Ts65Dn mice that model Down syndrome and Alzheimer's disease. Behavioural Neuroscience, v.115, p. 1239-46.

Infantino V., Castegna A., Iacobazzi F., Spera I., Scala I., Andria G., Iacobazzi V. (2011). Impairment of methyl cycle affects mitochondrial methyl availability and glutathione level in Down's syndrome: Molecular Genetic Metabolic, v.102, p.378-82.

Innis S.M. (2008).Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain: Brain research, v.1237, p.35-43.

Insausti A.M., Megías M., Crespo D., Cruz-Orive L.M., Dierssen M., Vallina I.F., Insausti R., Flórez J., Vallina T.F. (1998). Hippocampal volume and neuronal number in Ts65Dn mice: a murine model of down síndrome: Neuroscience Letters, v.253, p.175-8.

Jacob T.C., Moss S.J., Jurd R. (2008). GABA (A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition: Natural Review of Neuroscience, v. 9, p.331-43.

Jacobson L.H., Cryan J.F. (2008). Evaluation of the anxiolytic-like profile of the GABAB receptor positive modulator CGP7930 in rodents: Neuropharmacology, v. 54, p.854-62

Jansen D., Zerbi V., Janssen C.I., van Rooij D., Zinnhardt B., Dederen P.J., Wright A.J., Broersen L.M., Lütjohann D., Heerschap A., Kiliaan A.J.(2014). Impact of a multi-nutrient diet on cognition, brain metabolism, hemodynamics, and plasticity in apoE4 carrier and apoE knockout mice: Brain Structure Function, v.219, p.1841-68.

Janssen C.I, Kiliaan AJ. (2014). Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration: Progress in Lipid Research.v, 53, p.1-17.

Janssen C.I., Kiliaan A.J. (2014). Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration: Progrees in Lipid Research, v.53, p.1-17, doi: 10.1016/j.plipres.2013.10.002. Epub 2013 Oct 24

Janssen C.I., Zerbi V ., Mutsaers M.P., de Jong B.S., Wiesmann M., Arnoldussen IA., Geenen B., Heerschap A., Muskiet FA., Jouni ZE., van Tol E.A., Gross G., Homberg JR., Berg BM., Kiliaan AJ.(2015). Impact of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on cognition, motor skills and hippocampal neurogenesis in developing C57BL/6J mice: The Journal of Nutricional Biochemistry, v.26, p.24-35, doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.08.002. Epub 2014 Sep 28.

Jarrold C., Cocksey J., Dockerill E. (2008). Phonological similarity and lexicality effects in children's verbal short-term memory: concerns about the interpretation of

probed recall data: Quarterly journal of experimental psychology (Hove) v.61, p.324-40.

Jayaprakasha G.K., Jaganmohan L.R., KK Sakariah. (2009). Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin: Food chemistry, v.98, p.720-24.

Jensen S., Kirkegaard L., Anderson B.N. (1987). Randomized clinical investigation of Ro 15-1788, a benzodiazepine antagonist, in reversing the central effects of flunitrazepam: European Journal of Anaesthesiology, v.4, p.113-8.

Jernigan T.L., Bellugi U., Sowell E., Doherty S., Hesselink J.R. (1993). Cerebral morphologic distinctions between Williams and down syndromes: Archives of neurology, v.45, p.186-91.

Jones C.R., Arai T., Rapoport S.L. (1997). Evidence for the involvement of docosahexaenoic acid in cholinergic stimulated signal transduction at the synapse: Neurochemical research, v.22, p663-70.

Jovanovic S.V., Clements D., MacLeod K. (1998). Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome: Free radical biology and medicine, v.25, p.1044-8.

Kahlem P., Sultan M., Herwig R., Steinfath M., Balzereit D., Eppens B., Saran N.G., Pletcher M.T., South S.T., Stetten G., Lehrach H., Reeves R.H., Yaspo M.L .(2004). Transcript level alterations reflect gene dosage effects across multiple tissues in a mouse model of down syndrome: Genome Research, v.14, p.1258-67.

Kanamori G., Witter M., Brown J., Williams-Smith L. (2000). Otolaryngologic manifestations of Down syndrome: Otolaryngologic Clinics North America, v. 33, p.1285-92.

Kang S.K., Chang S.H., Jeon H.G. (2006). Curcumin-induced histone hypoacetylation enhances caspase-3-dependent glioma cell death and neurogenesis of neural progenitor cells: Stem Cells Development, v.15, p.165-74.

Kasai H., Matsuzaki M., Noguchi J., Yasumatsu N., Nakahara H. (2003). Structure-stability-function relationships of dendritic spines: Trends in Neuroscience, v.26, p.360-8.

Kaufmann W.E., Moser H.W. (2000). Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation: Cerebral Cortex, v.10, p.981-91.

Kawakita K ., Kawai N ., Kuroda Y., Yasashita S., Nagao S.(2006). Expression of matrix metalloproteinase-9 in thrombin-induced brain edema formation in rats: the official journal of National Stroke Association, v.15, p.88-95.

Kazim S.F., Blanchard J., Bianchi R., Iqbal K. (2017).Early neurotrophic pharmacotherapy rescues developmental delay and Alzheimer's-like memory deficits in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: Science Report, v.7, p.455-61, doi: 10.1038/srep45561.

Kentrup H., Becker W., Heukelbach, J., Wilmes A., Schürmann A., Huppertz C., Kainulainen H., 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: The Journal of Biologycal Chemistry: v. 271, p.3488-95.

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, v.44, p. 1039-45.

Kim DS., Kim J.Y, Han Y. (2012). Curcuminoids in neurodegenerative diseases: Recent Patents on CNS Drug Discovery (Discontinued), v.7, p.184-204.

Kim H.S., Suh Y.H. (2009). Minocycline and neurodegenerative diseases: Behavior Brain Research, v.196, p.168-79.

Kim H.Y., Spector A.A., Xiong Z.M. (2011). A synaptogenic amide N-docosahexaenoylethanolamide promotes hippocampal development Prostaglandins & other lipid mediators, v.96, p.1-4.

Kim S.H., Vlkolinsky R., Cairns N., Lubec G. (2000). Decreased levels of complex III core protein 1 and complex V beta chain in brains from patients with Alzheimer's disease and Down syndrome: Cell Molecular Life Science, v. 57, p.1810-6.

Kim S.J., Hijo, T. G., ParK, H.R., Park, M., Kim M.S., Kim S. A., Chung H.Y., Mattson M.P., Lee, J. (2008). Curcumin enhances neurogenesis and cognition in aged rats:

implications for transcriptional interactions related to growth and synaptic plasticity: Journal of biological chemistry, v.283, doi: 10.1074/jbc.M708373200.

Kim, S.J., Son, T.G., Park H.R., Park M., Kim M.S., Kim H.S., Chung H.Y., Mattson M.P., Lee, J. (2008). Curcumin stimulates proliferation of embryonic neural progenitor cells and neurogenesis in the adult hippocampus: journal of biological chemistry, v.283, doi: 10.1074 / jbc.M708373200.

Kleschevnikov A. M., Belichenko P. V., Faizi M., Jacobs L. F., Htun K., Shamloo M., Mobley W. C. (2012a). Deficits in cognition and synaptic plasticity in a mouse model of Down syndrome ameliorated by GABAB receptor antagonists: The Journal of Neuroscience, v.32, p.9217-27.

Kleschevnikov A.M., Belichenko P.V., Gall J., George L., Nosheny R., Maloney M.T., Salehi A., Mobley W.C. (2012b). Increased efficiency of the GABAA and GABAB receptor-mediated neurotransmission in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: Neurobiology of Disease, v.45, p.683-91.

Kleschevnikov A.M., Belichenko P.V., Villar A.J., Epstein C.J., Malenka R.C., Mobley W.C. (2004). Hippocampal long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome: Journal of Neuroscience, v.24, p.8153-60.

Knust H., Achermann G., Ballard T., BuettelmannB., Gasser R., Fischer H., Hernandez M.C., Knoflach F., Koblet A., Stadler H., Thomas A.W., Trube G., Waldmeier P. (2009). The discovery and unique pharmacological profile of RO4938581 and RO4882224 as potent and selective GABAA alpha5 inverse agonists for the treatment of cognitive dysfunction. Bioorganic & medicinal chemistry letters, v.19, p.5940-4.

Korbel J.O., Tirosh-Wagner T., Urban A.E., Chen X.N., Kasowski M., Dai L., Grubert F., Erdman C., Gao M.C., Lange K., Sobel E.M., Barlow G.M., Aylsworth A.S., Carpenter N.J., Clark R.D., Cohen M.Y., Doran E., Falik-Zaccai T., Lewin S.O., Lott I.T., McGillivray B.C., Moeschler J.B., Pettenati M.J., Pueschel S.M., Rao K.W., Shaffer L.G., Shohat M., Van Riper A.J., Warburton D., Weissman S., Gerstein M.B., Snyder M., Korenberg J.R. (2009). The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.106, p.12031-6.

Kraemer B.R., Yoon S.O., Carter B.D. (2014). The biological functions and signaling mechanisms of the p75 neurotrophin receptor: Handbook Experimental Pharmacology, v. 220, p.121-64, doi: 10.1007/978-3-642-45106-5_6.

Krasuski J.S., Alexander G.E., Horwitz B., Rapoport S.I., Schapiro M.B. (2002). Relation of medial temporal lobe volumes to age and memory function in nondemented adults with Down's syndrome: implications for the prodromal phase of Alzheimer's disease: The American journal of psychiatry, v.159, p.74-81.

Kronquist K.E., Dreazen E., Keener S.L., Nicholas T.W., Crandall B.F. (1990). Reduced fetal hepatic alpha-fetoprotein levels in Down's syndrome: Prenatal Diagnostic, v.10, p.739-51.

Kurabayashi N., Sanada K. (2013). Increased dosage of DYRK1A and DSCR1 delays neuronal differentiation in neocortical progenitor cells: Genes & Development, v. 27, p.2708-21.

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 Research, v.858, p.191-97.

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 síndrome: Brain Research, v.1022, p.101-09.

Kuwara T., Hsieh J., Muotri A., Yeo G., Warashina M., Lie D.C., Moore L., Nakashima K., Asashima M., Gage F.H. (2009). Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis: Natural neuroscience, v.; 12, p. 1097-1105.

Lana-Elola E., Watson-Scales S.D., Fisher E.M., and Tybulewicz V.L. (2011). Down syndrome: searching for the genetic culprits: Disease Models & Mechanisms, v.4, p.586-95.

Lanfranchi S., Baddeley A., Gathercole S., Vianello R. (2012). Working memory in Down syndrome: is there a dual task deficit? Journal Intellectual Disability Research: v.56, p.157-66.

Largo N., guyen N., Dongliang M.A., Shui G., Wong P., Cazenave-Gassiot A., Zhang X., Wenk R.W., Eyleen L. K G., Plata D.L. (2014). Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid: Nature, v.509, p.503-6.

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: Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger, v.190, p .421-7.

Laws G., Bishop D.V. (2003). A comparison of language abilities in adolescents with Down syndrome and children with specific language impairment. Journal Speech Lang Hear Research: v.46, p.1324-39.

Laws G., Briscoe, J., Ang S.Y., Brown H., Hermena E., Kapikian A. (2014). Receptive vocabulary and semantic knowledge in children with SLI and children with Down syndrome: Children Neuropsychology, v.15, p.1-19.

Lee A.Y., Choi J.M., Lee J, Lee M.H, Lee S, Cho E.J. (2016). Effects of Vegetable Oils with Different Fatty Acid Compositions on Cognition and Memory Ability in Aβ25-35-Induced Alzheimer's Disease Mouse Model: Journal of medicinal food, v.19, p.912-21.

Lee H.C., Tan K.L., Cheah P.S., Ling K.H. (2016). Potential Role of JAK-STAT Signaling Pathway in the Neurogenic-to-Gliogenic Shift in Down Syndrome Brain: Neuro plasticity, v., doi: 10.1155/2016/7434191.

Lei Q., Ba S., Zhang H., Wei Y., Lee J.Y., Li T.(2016).Enrichment of omega-3 fatty acids in cod liver oil via alternate solvent winterization and enzymatic interesterification: Food and Chemical, v.199,p.364-71.

Li SS., Qu Z., Haas M., Ngo L., Heo YJ., Kang HJ., Britto JM., Cullen HD., Vanyai HK., Tan SS., Chan-Ling T., Gunnersen JM., Heng JI. (2016) The HSA21 gene EURL/C21ORF91 controls neurogenesis within the cerebral cortex and is implicated in the pathogenesis of Down syndrome: Scientific reports, v.6, doi: 10.1038 / srep29514.

Li X., Liu R.H., Cao H., Li J. (2009). Effects of curcumin on behavior and p-ERK, p-CREB, c-fos expression in dorsal root ganglion in chronic constrictive injury rats: Chinnese Jounal of applied physiology

Li Y.Y., Alexandrov P.N., Pogue A.I., Zhao Y., Bhattacharjee S., Lukiw W.J. (2012). miRNA-155 upregulation and complement factor H deficits in Down's syndrome: Neuroreport, v.23, p.168-73.

Liao K.K., Wu M.J., Chen P.Y., Huang S.W., Chiu S.J., Ho, C.T., Yen J.H. (2012). Curcuminoids promote neurite outgrowth in PC12 cells through MAPK/ERK- and PKC-dependent pathways Journal of Agricultural and food chemistry, v.60, p.433-43.

Lingford-Hughes, A., Hume, S.P., Feeney, A., Hirani, E., Osman, S., Cunningham, V.J., Pike, V.W., Brooks, D.J., and Nutt, D.J. (2002). Imaging the GABA-benzodiazepine receptor subtype containing the alpha5-subunit in vivo with [11C] Ro15 4513 positron emission tomography: Journal of cerebral blood flow and metabolism, v.22, p.878-89.

Lister R.G. (1985). The amnesic action of benzodiazepines in man: Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.9, p.87-94.

Liu D.P., Schmidt C., Billings T., and Davisson M.T. (2003). Quantitative PCR genotyping assay for the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: Biotechniques, v.35, p.1170-4, 1176-8 passim.

Liu F., Liang Z., Wegiel J., Hwang Y. W., Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Ramakrishna N., Gong C.X. (2008). Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome: Journal of Faseb, v. 22, p.3224-3233.

Liu J.J., Green P., John Mann J.J., Rapoport S., Sublette M.E. (2015). Pathways of Polyunsaturated Fatty Acid Utilization: Implications for Brain Function in Neuropsychiatric Health and Disease: Brain research, doi: 10.1016/j.brainres.2014.11.059.

Liu S., Cao Y., Qu M., Zhang Z., Feng L., Ye Z., Xiao M., Hou S.T., Zheng R., Han Z. (2016). Curcumin protects against stroke and increases levels of Notch intracellular domain: Neurologycal Research, v.38, p.553-9.

Liu Y.F., Chen H.I., Wu C.L., Kuo Y.M., Yu L., Huang A.M., Wu FS., Chuang, J.I., Jen C.J. (2009).Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: roles of amygdalar brain-derived neurotrophic

factor and synaptotagmin I:Journal Physiology,v.587, doi: 10.1113 / jphysiol.2009.173088.

Liu Z. J, Li Z.H., Liu L., Tang W.X, Wang Y., Dong M.R., Xiao C. (2016). Curcumin Attenuates Beta-Amyloid-Induced Neuroinflammation via Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Function in a Rat Model of Alzheimer's Disease: Fronters Pharmacology, v.261, doi: 10.3389/fphar.2016.00261.

Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-ΔΔCt Method: Methods, v.25, p.402–08.

Llorens-Martín M.V., Rueda N., Tejeda G.S., Flórez J., Trejo J.L., Martínez-Cué C. (2010). Effects of voluntary physical exercise on adult hippocampal neurogenesis and behavior of Ts65Dn mice, a model of Down syndrome: Neuroscience, v.171, p.1228-40.

Loane M., Morris J.K., Addor M.C., Arriola L., Budd J., Doray B., Garne E., Gatt M., Haeusler M., Khoshnood B., Klungsøyr Melve K., Latos-Bielenska A., McDonnell B., Mullaney C., O'Mahony M., Queiβer-Wahrendorf A., Rankin J., Rissmann, A., Rounding C., Salvador J., Tucker D., Wellesley D., Yevtushok L. and Dolk H. (2013). Twenty-year trends in the prevalence of Down syndrome and other trisomies in Europe: impact of maternal age and prenatal screening: European Journal of Human Genetics, v.21, p.27-33.

Lockrow J., Prakasam A., Huang P., Bimonte-Nelson H., Sambamurti K., Granholm A.C. (2009). Cholinergic degeneration and memory loss delayed by vitamin E in a Down syndrome mouse model. Experimental Neurology, v.216, p.278-89.

Lorenzi H.A., Reeves R.H. (2006). Hippocampal hypocellularity in the Ts65Dn mouse originates early in development: Brain Research, v.1104, p.153-59.

Lott I.T., Dierssen M. (2010). Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with Down's syndrome: The Lancet. Neurology, v.6, p.623-33.

Lu Q.R., Sun T., Zhu Z., Ma N., Garcia M., Stiles C.D., and Rowitch D.H. (2002). Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection: Cell, v.109, p.75-86.

Lubec B., Yoo B.C., Dierssen M., Balic N., Lubec G. (2001). Down syndrome patients start early prenatal life with normal cholinergic, monoaminergic and serotoninergic innervation: Journal of neural transmission. Supplementum, v.61, p.303-10.

Lyle R., Béna F., Gagos S., Gehrig C., Lopez G., Schinzel A., Lespinasse J., Bottani A., Dahoun S., Taine L., Doco-Fenzy M., Cornillet-Lefèbvre P., Pelet A., Lyonnet S., Toutain A., Colleaux L., Horst J., Kennerknecht I., Wakamatsu N., Descartes M., Franklin J.C., Florentin-Arar L., Kitsiou S., Aït Yahya-Graison E., Costantine M., Sinet P.M., Delabar J.M., Antonarakis S.E. (2009). Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21: European journal of human genetics, v.4, p.454-66.

Madsen T.M., Newton S.S., Eaton M.E., Russell D.S., Duman R.S. (2003). Chronic electroconvulsive seizure up-regulates beta-catenin expression in rat hippocampus: role in adult neurogenesis: Biologycal Psychiatry, v.54, p.1006-14.

Mahar I., Bambico F.R., Mechawar N., Nobrega J.N. (2014). Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects: Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.38, p.173-92.

Maisonpierre P.C., Belluscio L., Friedman B., Alderson R.F., Wiegand S.J., Furth M.E., Lindsay R.M., Yancopoulos G.D. (1990). NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression: Neuron, v.5, p.501-9.

Malberg J.E., Eisch A.J., Nestler E.J., and Duman R.S. (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus: Journal of Neuroscience, v.20, p.9104-10.

Maltese A., Pepi A., Scifo L., Roccella M. (2014). Referential communication skills in children with Down syndrome: Minerva Pediatric, v. 66, p.7-16.

Mao R., Wang X., Spitznagel E.L., Frelin L.P., Ting J.C., Ding H., Kim J.W., Ruczinski I., Downey T.J., and Pevsner J. (2005). Primary and secondary transcriptional effects in the developing human Down syndrome brain and heart: Genome Biology v. 6, R107.

Mårild K., Stephansson O., Grahnquist L., Cnattingius S., Söderman G., Ludvigsson J.F. (2013). Down syndrome is associated with elevated risk of celiac disease: a nationwide casecontrol study. Journal Pediatric, v. 163, p.237-42.

Marin-Padilla M. (1976). Pyramidal cell abnormalities in the motor cortex of a child with Down's syndrome. A Golgi study: Journal Complement Neurology, v. 167, p.63-81.

Martin B.S., Corbin J.G., Huntsman M.M. (2014).Deficient tonic GABAergic conductance and synaptic balance in the fragile X syndrome amygdala: Journal Neurophysiology, v.112,p.890-2, doi: 10.1152/jn.00597.2013. Epub 2014 May 21.

Martin L.J., Oh G.H., Orser B.A. (2009). Etomidate targets alpha5 gamma-aminobutyric acid subtype A receptors to regulate synaptic plasticity and memory blockade: Anesthesiology, v.111, p.1025–35.

Martínez-Cué C., Baamonde C., Lumbreras M., Paz J., Davisson M. T., Schmidt C., Dierssen M., Flórez J. (2002). Differential effects of environmental enrichment on behavior and learning of male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome: Behavioural Brain Research, v.134, p.185-00.

Martínez-Cué C., Delatour B., Potier M.C. (2014). Treating enhanced GABAergic inhibition in Down syndrome: use of GABA α5-selective inverse agonists: Neuroscience and biobehavioral reviews, v.2, p.218-27.

Martínez-Cué C., Martínez P., Rueda N., Vidal R., García S., Vidal V., Corrales A., Montero J.A., Pazos Á., Flórez J., Gasser R., Thomas A.W., Honer M., Knoflach F., Trejo J.L., Wettstein J.G., Hernández M.C. (2013). Reducing GABAA α5 receptor-mediated inhibition rescues functional and neuromorphological deficits in a mouse model of down syndrome: Journal of Neuroscience, v.33, p.3953-66.

Martínez-Cué C., Rueda N., García E., Davisson M.T., Schmidt C., Flórez J. (2005). Behavioral, cognitive and biochemical responses to different environmental conditions in male Ts65Dn mice, a model of Down syndrome: Behavioural Brain Research, v.163, p.174-85.

Martínez-Cué C., Rueda N., García E., Flórez J. (2006). Anxiety and panic responses to a predator in male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome: Genes Brain Behavior, v.5, p.413-22.

Masaru M., Kimuraa S., Endoa T., Hamauea N., Hirafujia M., Togashib H., Matsumotob M., Yoshiokab M., Saitob H., Watanabec S., Kobayashic T., Okuyamac H. (1997). Dietary Docosahexaenoic Acid Increases Cerebral Acetylcholine Levels and Improves Passive Avoidance Performance in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats: Pharmacology, biochemistry and behavior, v.58, doi: 10.1016/S0091-3057(97)00300-6.

Maubach K. (2003). GABA (A) receptor subtype selective cognition enhancers: Curring Drug Targets CNS Neurology Disorders, v. 2, p.233–39.

McNamara R.K, Capaz J.A., Liu Y., Jandacek R., Rider T., TSO P., Lipton J.W. (2013). Omega-3 fatty acid deficiency does not alter the effects of chronic fluoxetine treatment on central serotonin turnover or behavior in the forced swim test in female: Pharmacology Biochemical Behavior, p. 114-115: 1-8. doi: 10.1016 / j.pbb.2013.09.010.

McNamara R.K., Able J., Liu Y., Jandacek R., Rider T., Tso P., Lipton J.W. (2009). Omega-3 fatty acid deficiency during perinatal development increases serotonin turnover in the prefrontal cortex and decreases midbrain tryptophan hydroxylase-2 expression in adult female rats: dissociation from estrogenic effects: Journal of Psychiatric Research, v.53, p.656-63.

McNamara R.K., Jandacek R., Rider T., Tso P., Straus A., W J.L.(2010). Omega-3 Fatty Acid Deficiency Increases Constitutive Pro-Inflammatory Cytokine Production in Rats: Relationship with Central Serotonin Turnover: Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, v.83, doi: 10.1016/j.plefa.2010.08.004.

Medina J.M., Tabernero A. (2002).Astrocyte-synthesized oleic acid behaves as a neurotrophic factor for neurons: Journal of Neurochemical, v.96, p.265-71.

Megías M., Verduga R., Dierssen M., Flórez J., Insausti R., Crespo D. (1997). Cholinergic, serotonergic and catecholaminergic neurons are not affected in Ts65Dn mice: Neuroreport, v.8, p.3475-78.

Merschman S.A., Rose M.J., Pearce G.E., Woolf E.J., Schaefer B.H., Huber A.C., Musson D.G., Perry K.J., Rush D.J., Varsolona R.J., Matuszewski B.K. (2005). Characterization of the solubility of a poorly soluble hydroxylated metabolite in human urine and its implications for potential renal toxicity: Pharmazie, v.60, p.359-63.

Mi S., Lee X., Shao Z., Thill G., Ji B., Relton J., Levesque M., Allaire N., Perrin S., Sands B., Crowell T., Cate RL., McCoy J.M., Pepinsky R.B. (2004) LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex: Nature Neuroscience, v.3. P.221-8.

Millan Sanchez M., Heyn S.N., Das D., Moghadam S., Martin K.J., Salehi A. (2011). Neurobiological elements of cognitive dysfunction in down syndrome: exploring the role of APP: Biological psychiatry, v.71, p.403-9.

Mohajeri M., Sadeghizadeh H., Najafi F., Javán M. (2015). Polymerized nano-curcumin attenuates neurological symptoms in EAE model of multiple sclerosis through down regulation of inflammatory and oxidative processes and enhancing neuroprotection and myelin repair: Neuropharmacology, v.99, p.156-67.

Möhler H. (2007). Molecular regulation of cognitive functions and developmental plasticity: impact of GABAA receptors: Journal of Neurochemistry, v.102, p.1-12.

Mohler H., Fritschy J.M., Lüscher B., Rudolph U., Benson J., and Benke D. (1996). The GABAA receptors. From subunits to diverse functions: Ion Channels, v.4, p.89-113.

Morris H.V., Dawson G.R., Reynolds D.S., Atack J.R., Stephens D.N. (2006). Both alpha2 and alpha3 GABAA receptor subtypes mediate the anxiolytic properties of benzodiazepine site ligands in the conditioned emotional response paradigm: European Journal of Neuroscience, v.23, p.2495-504.

Morris R. G., Garrud P., Rawlins J.N., O'Keefe J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions: Nature, v.297, p.681-3.

Morris R.G., Schenk F., Tweedie F., Jarrard L.E. (1990). Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning. European Journal of Neuroscience, v.2, p.1016-28.

Motaghinejad M., Motevalian M., Fatima S., Hashemi H., Gholami, and M. (2017).Curcumin confers neuroprotection against alcohol-induced hippocampal neurodegeneration via CREB-BDNF pathway in rats: Biomedical and pharmacotherapy, v.87, p.721-40.

Mythri R.B., Bharath M.M. (2012). Curcumin: a potential neuroprotective agent in Parkinson's disease: Current Pharmaceutical Design, v.18, p.91-9.

Nadezhdin K.D., García-Carpio I., Goncharuk S.A., Mineev K.S., Arseniev AS., Vilar M. (2016). Structural Basis of p75 Transmembrane Domain Dimerization: Journal of Biologycal Chemistry, v.291, doi: 10.1074 jbc.M116.723585.

Nam S.M., Choi J.H., Yoo D.Y., Kim W., Jung H.Y., Kim J.W., Yoo M., Lee S., Kim C.J., Yoon Y.S., Hwang I.K. (2014). Effects of curcumin (Curcuma longa) on learning and spatial memory as well as cell proliferation and neuroblast differentiation in adult and aged mice by upregulating brain-derived neurotrophic factor and CREB signaling: Journal medical food, v.17, p.641-9.

Nash H., Heath J. (2011). The role of vocabulary, working memory and inference making ability in reading comprehension in Down syndrome: Research Development Disability, v. 32, p.1782-91.

Navarro J.F., Burón E., Martín-López M. (2002). Anxiogenic-like activity of L-655,708, a selective ligand for the benzodiazepine site of GABA(A) receptors, which contain the alpha-5 subunit, in the elevated plus-maze test: Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, v.26, p.1389-92.

Nelson T.L. (1961). Serum protein and lipoprotein fractions in mongolism: American Journal disease Children, v. 102, p.369-74.

Netzer W.J., Powell C., Nong Y., Blundell J., Wong L., Duff K., Flajolet M., Greengard P. (2010). Lowering beta-amyloid levels rescues learning and memory in a Down syndrome mouse model: PLoS One 5, e10943.

Newpher T.M., Ehlers M.D. (2009). Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity: Trends in cell biology, v.19, p.218-27.

Ng T.P., Chiam P.C., Lee T., Chua H.C., Lim L., Kua E.H. (2006). Curry consumption and cognitive function in the elderly: American journal epidemiology, v.164, p.898-906.

Nguyen L., Malgrange B., Breuskin I., Bettendorff L., Moonen G., Belachew S., Rigo J.M. (2003). Autocrine/paracrine activation of the GABA(A) receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive

(PSA-NCAM+) precursor cells from postnatal striatum: The Journal of neuroscience, v.23, p.3278-94.

Nishikawa M., Kimura S., Akaike N. (1994). "Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor ε1 subunit": Journal of Phisiology, v. 475, p. 83-93.

Olsen R.W., Sieghart W. (2008). International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid (A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update: Pharmacological reviews, v.60, p.243-60

Olsen R.W., Sieghart W. (2009). GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology: Neuropharmacology, v.56, p.141-48. Experimental Biology journal, v.4, p.1469-80.

Pallardó F.V., Degan P., d'Ischia M., Kelly F.J., Zatterale A., Calzone R., Castello G., Fernandez Delgado R., Dunster C., Lloret A., Manini P., Pisanti M.A., Vuttariello E., Pagano G. (2006). Multiple evidence for an early age pro-oxidant state in Down syndrome patients: Biogerontology, v.7, p.211-20.

Pan MH., Huang T.M., Lin J.K. (1999).Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice: Drug metabolism and disposition, v.27, p.486-94.

Parisotto E.B., Vidal V., García-Cerro S., Lantigua S., Wilhelm Filho D., Sanchez-Barceló E.J., Martínez-Cué C., Rueda N.(2016).Chronic Melatonin Administration Reduced Oxidative Damage and Cellular Senescence in the Hippocampus of a Mouse Model of Down Syndrome: Neurochemical Research, v.41,p.2004-13.

Patterson D. (2009). Molecular genetic analysis of Down syndrome: Human Genetics, v.129, p. 195-214.

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: Intellectual Journal Development Neuroscience, v. 21, p. 117-124.

Pennington B.F., Moon J., Edgin J., Stedron J., Nadel L. (2003). The neuropsychology of Down syndrome: evidence for hippocampal dysfunction: Child development, v.74, p.75-93.

Perez-Cremades D., Hernandez S., Blasco-Ibanez J.M., Crespo C., Nacher J., Varea E. (2010). Alteration of inhibitory circuits in the somatosensory cortex of Ts65Dn mice, a model for Down's syndrome: Journal of Neural Transmission, v.117, p.445-55.

Perluigi M., Butterfield D.A. (2011). The identification of protein biomarkers for oxidative stress in Down syndrome: Expert Review of Proteomics, v. 8, p. 427-29.

Perluigi M., Butterfield D.A. (2012). Oxidative Stress and Down syndrome: A Route toward Alzheimer-Like Dementia. Current Gerontology´s and Geriatrics Research, doi: 10.1155 / 2012 / 724.904.

Perluigi M., di Domenico F., Fiorini A., Cocciolo A., Giorgi A., Foppoli C., Butterfield D.A., Giorlandino M., Giorlandino C., Schininà M.E., Coccia R. (2011). Oxidative stress occurs early in Down syndrome pregnancy: A redox proteomics analysis of amniotic fluid: Proteomic Clinical Apply, v. 5, p.167-78.

Petrosini L., Leggio, M.G., Molinari M. (1998). The cerebellum in the spatial problem solving: a co-star or a guest star? Progres of Neurobiology, v. 56, p. 191-210.

Piermartiri T.C., Pan H., Chen J., McDonough J., Grunberg N., Apland J.P., Marini A.M. (2015). Alpha-Linolenic Acid-Induced Increase in Neurogenesis is a Key Factor in the Improvement in the Passive Avoidance Task after Soman Exposure: Neuromolecular Medical, v.17, p.251-69,. doi: 10.1007/s12017-015-8353-y. Epub 2015 Apr 29.

Pinal C.S., Tobin A.J. (1998). Uniqueness and redundancy in GABA production: Perspectives on developmental neurobiology, v.5, p.109-18.

Pinter J.D., Brown W.E., Eliez S., Schmitt J.E., Capone G.T., Reiss A.L. (2001a). Amygdala and hippocampal volumes in children with Down syndrome: a high-resolution MRI study: Neurology, v.56, p.972-74.

Pinter, J.D., Eliez, S., Schmitt, J.E., Capone, G.T., and Reiss, A.L. (2001b). Neuroanatomy of Down's syndrome: a high-resolution MRI study. Am J Psychiatry 158, 1659-65.

Pluta R., Bogucka-Kocka A., Ułamek-Kozioł M., Furmaga-Jabłońska W., Januszewski, S., Brzozowska J., Jabłoński M., Kocki J. (2015). Neurogenesis and neuroprotection in postischemic brain neurodegeneration with Alzheimer phenotype: is there a role for curcumin? Folia Neuropathologica, v.53, p.89-99.

Pofantis H., Papatheodoropoulos C. (2014). The alpha5GABAA receptor modulates the induction of long-term potentiation at ventral but not dorsal CA1 hippocampal synapses: Synapse, v.68, p.394–401.

Pollonini G., Gao V., Rabe A., Palminiello S., Albertini G., Alberini C.M. (2008). Abnormal expression of synaptic proteins and neurotrophin-3 in the Down syndrome mouse model Ts65Dn: Neuroscience, v.156, p.99-106.

Polo-Hernández E., De Castro F., García-García A.G., Tabernero A., Medina J.M. (2010). Oleic acid synthesized in the periventricular zone promotes axonogenesis in the striatum during brain development: Journal Neurochemistry, v.114, p.1756-66.

Polo-Hernández E., Tello V., Arroyo A. A, Domínguez-Prieto M., de Castro F., Tabernero A, Medina J.M. (2014). Oleic acid synthesized by stearoyl-CoA desaturase (SCD-1) in the lateral periventricular zone of the developing rat brain mediates neuronal growth, migration and the arrangement of prospective synapses: Brain research, v.1570, p.13-25.

Popov V.I., Kleschevnikov A.M., Klimenko O.A., Stewart M.G., Belichenko P.V. (2011). Three-dimensional synaptic ultrastructure in the dentate gyrus and hippocampal area CA3 in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: Journal of Comparative Neurology, v.519, p.1338-54.

Potier M.C., Braudeau J., Dauphinot L., Delatour B. (2014). Reducing Gabaergic Inhibition Restores Cognitive Functions in a Mouse Model of Down Syndrome: CNS Neurol Disord Drug Targets, v.13, p.8-15.

Prandini P., Deutsch S., Lyle R., Gagnebin M., Delucinge Vivier C., Delorenzi M., Gehrig C., Descombes P., Sherman S., Dagna Bricarelli F., Baldo C., Novelli A., Dallapiccola B., Antonarakis S.E. (2007). Natural gene-expression variation in Down syndrome modulates the outcome of gene-dosage imbalance: American journal of human genetics, v.81, p.252-63.

Prinz M., Prinz B., Schulz, E. (1997). The growth of non-pyramidal neurons in the primary motor cortex of man: a Golgi study: Histologycal Histopathology,v. 12, p.895-900.

Pritchard M. A., Kola I. (1999), The "gene dosage effect" hypothesis versus the "amplified developmental instability" hypothesis in Down syndrome: Journal of Neural Transmission, v.57, p.293-303.

Qi Z., Zhang H., Fu C., Liu X., Chen B., Dang Y., Chen H., Liu, L. (2017). Prolonged hydrocephalus induced by intraventricular hemorrhage in rats is reduced by curcumin therapy: Neuroscience Letters, v.637, p.120-25.

Ramakrishna N., Meeker HC., Brown W.T. (2016).Novel Epigenetic Regulation of Alpha-Synuclein Expression in Down syndrome: Molecular Neurobiology, v.53, p.155-62, doi: 10.1007/s12035-014-8979-z. Epub 2014 Nov 23.

Rashid M.A., Katakura M., Kharebava S.G., Kevala K., Kim H.Y. (2013). N-Docosahexaenoylethanolamine is a potent neurogenic factor for neural stem cell differentiation: journal of Neurochemisry, v.125, p.869-84.

Raz N., Torres I.J., Briggs S.D., Spencer W.D., Thornton A.E., Loken W.J., Gunning F.M., McQuain J.D., Driesen N.R., Acker J.D. (1995). Selective neuroanatomic abnormalities in Down's syndrome and their cognitive correlates: evidence from MRI morphometry: Neurology, v.45, p.356-66.

Reeves R.H., Irving N.G., Moran T.H., Wohn A., Kitt, C., Sisodia S.S., Schmidt, C., Bronson, R.T., Davisson, M.T. (1995). A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits: Natural Genetics, v. 11, p.177-84.

Reeves R.H. (2000). Recounting a genetic story: Nature 405, 283-284.

Regueras L., Prieto P., Muñoz-Calvo M.T., Pozo J., Arguinzoniz L., Argente J. (2011). Endocrinological abnormalities in 1,105 children and adolescents with Down syndrome: Medical Clinic (Barcelona) v.136, p.376-81.

Reichardt L.F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways: Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biologycal Science. V.361, doi: 10.1098 / rstb.2006.1894.

Reynolds G.P., Warner C.E. (1988). Amino acid neurotransmitter deficits in adult Down's syndrome brain tissue: Neuroscience Letters, v.94, p.224-27.

Risser D., Lubec G., Cairns N., Herrera-Marschitz M. (1997). Excitatory amino acids and monoamines in parahippocampal gyrus and frontal cortical pole of adults with Down syndrome: Life Science, v.60, p.1231-37.

Roberts J.E., Price J., Malkin C. (2007). Language and communication development in Down syndrome: Mental retardation and developmental disabilities research reviews, v.13, p.26-35.

Robertson R.T., Baratta J., Yu J., Guthrie K.M. (2006). A role for neurotrophin-3 in targeting developing cholinergic axon projections to cerebral cortex: neuroscience, v.143, p.523-39.

Robson LG., Dyall S., Sidloff D., Michael-Titus A.T (2010). Omega-3 polyunsaturated fatty acids increase the neurite outgrowth of rat sensory neurones throughout development and in aged animals. Neurobiologycal Aging, v.31, p.678-87.

Rodríguez-Rodríguez R.A., Tabernero A., Velasco A., Lavado E.M., Medina J.M. (2004). The neurotrophic effect of oleic acid includes dendritic differentiation and the expression of the neuronal basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD2: Journal of neurochemistry, v.88, p.1041-51.

Roizen NJ., Patterson D. (2003), Down´s syndrome: Lancet, v.361, p.1281-9.

Roper R.J., Baxter L.L., Saran N.G., Klinedinst D.K., Beachy P.A., Reeves R.H. (2006a). Defective cerebellar response to mitogenic Hedgehog signaling in down [corrected] syndrome mice: Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A, v.103, p.1452-6.

Roper R.J., Reeves R.H. (2006). Understanding the basis for Down syndrome phenotypes: PLoS Genetics, v.2, p. e50.

Roper R.J., St John H.K., Philip J., Lawler A., Reeves R.H. (2006b). Perinatal loss of Ts65Dn Down syndrome mice: Genetics, v.172, p.437-43.

Rudolph U., Crestani F., Benke D., Brunig I., Benson J.A., Fritschy J.M., Martin J.R., Bluethmann H., Möhler H. (1999). Benzodiazepine actions mediated by specific -aminobutyric acidA receptor subtypes: Nature, v.401, p.796-800.

Rudolph U., Möhler H. (2006). GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions: Current Opinion in Pharmacology, v.6, p.18-23.

Rudolph U., Möhler H. (2013). GABAA Receptor Subtypes: Therapeutic Potential in Down syndrome, Affective Disorders, Schizophrenia, and Autism: Annual Review of Pharmacology and Toxicology, v.54, p.483-507.

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: Neuroscience Letters, v.433, p.22-27.

Rueda N., Flórez J., Martínez-Cué C. (2012). Mouse models of Down syndrome as a tool to unravel the causes of mental disabilities: Neural plasticity, v.2012, p.584071.

Rueda N., Mostany R., Pazos A., Flórez J., Martínez-Cué C. (2005). Cell proliferation is reduced in the dentate gyrus of aged but not young Ts65Dn mice, a model of down síndrome: Neuroscience Letters v.380, p.197-201.

Sairanen M., Lucas G., Ernfors P., Castrén M., Castrén E. (2005). Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus: Journal of Neuroscience, v.25, p.1089-94.

Salehi A., Delcroix J.D., Belichenko P.V., Zhan K., Wu C., Valetta J.S., Takimoto-Kimura R., Kleschevnikov A.M., Sambamurti K., Chung P.P., Xia W., Villar A., Campbell W.A., Kulnane L.S., Nixon R.A., Cordero B.T. Epstein C.J., Stokin G.B., Goldstein L.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, v.51, p.29-42.

Salehi A., Faizi M., Colas D., Valletta J., Laguna J., Takimoto-Kimura R., Kleschevnikov A., Wagner S.L., Aisen P., Shamloo M., Mobley W.C. (2009). Restoration of norepinephrine-modulated contextual memory in a mouse model of Down syndrome: Science Translational Medicine, v.1, p.7-17.

Sanmukhani J ., Satodia V ., Trivedi J ., Patel T ., Tiwari D ., Panchal B ., Goel A ., Tripathi C.B. (2014).Efficacy and safety of curcumin in major depressive disorder: a randomized controlled trial: Phytotherapy Research, v.28, p.579-85, doi: 10.1002/ptr.5025. Epub 2013 Jul 6.

Santarelli L., Saxe M., Gross C., Surget A., Battaglia F., Dulawa S., Weisstaub N., Lee J., Duman R., Arancio O., Belzung C., Hen R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants: Science, v.301, p.805-09

Sara S.J. (2009). The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition: Nature reviews. Neuroscience, v.10, p.211-23.

Sarter M., Bruno J.P., Berntson G.G. (2001). Psychotogenic properties of benzodiazepine receptor inverse agonists: Psychopharmacology (Berl), v.156, p.1-13.

Sasaki H., Sunagawa Y., Takahashi K., Imaizumi A., Fukuda H., Hashimoto, T., Wada, H., Katanasaka, Y., Kakeya, H., Fujita, M., Hasegawa, K., Morimoto, T. (2011). Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability: Biological and Pharmaceutical Bulletin, V.34, p.660-5.

Sasaki N., Kurisu J., Kengaku M. (2010). Sonic hedgehog signaling regulates actin cytoskeleton via Tiam1-Rac1 cascade during spine formation: Molecular and Cellular Neuroscience, V.45, p.335-44.

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 Research Molecular, v. 48, p. 53-9.

Schliebs R., Arendt T. (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration: Behavior Brain Research, v.221, p.555-63.

Schmid R.G., Tirsch, W.S., Rappelsberger P., Weinmann H.M., Pöppl S.J. (1992). Comparative coherence studies in healthy volunteers and Down's syndrome patients from childhood to adult age: Electroencephalograme Clinical Neurophysiology, v.83, p.112-23.

Schneider C., Risser D., Kirchner L., Kitzmüller E., Cairns N., Prast H., Singewald N., Lubec G. (1997). Similar deficits of central histaminergic system in patients with Down syndrome and Alzheimer disease: Neuroscience Letters, v. 222, p.183-6.

Schulz E., Scholz B. (1992). Neurohistological findings in the parietal cortex of children with chromosome aberrations: Journal für Hirnforschung v.33, p.37-62.

Scott B.S., Becker L.E., Petit T.L. (1983). Neurobiology of Down's syndrome: Progress Neurobiology, v. 21, p.199-237.

Seidl R., Cairns N., Singewald N., Kaehler ST., Lubec G. (2001). Differences between GABA levels in Alzheimer's disease and Down syndrome with Alzheimer-like neuropathology: Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, v.363, p.139-45.

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: Neuroscience Letters, v. 260, p. 9-12.

Sella F., Lanfranchi S., Zorzi M. (2013). Enumeration skills in Down syndrome. Research in Developmental Disability: v.34, p.3798-806.

Seo H., Isacson O. (2005). Abnormal APP, cholinergic and cognitive function in Ts65Dn Down's model mice: Experimental Neurology, v.193, p.469-80.

Seo H.J., Wang S.M., Han C., Lee, S.J., Patkar A.A, Masand P.S., Pae C.U. (2015). Curcumin as a putative antidepressant: Expert Revision Neurotherapeutics, v.15, p.269-80.

Seo J.S., Leem Y.H., Lee K.W., Kim S.W., Lee J.K., Han P.L. (2010). Severe motor neuron degeneration in the spinal cord of the Tg2576 mouse model of Alzheimer disease: Journal Alzheimers Disease, v.21, p.263-76.

Shah, S.N. (1979). Fatty acid composition of lipids of human brain myelin and synaptosomes: changes in phenylketonuria and Down's syndrome: Int. J. Biochem. V.10, p.477–82.

Shapiro B.L. (2001). Developmental instability of the cerebellum and its relevance to Down syndrome: Journal of neural transmission. Supplementum, v.61, p.11-34.

Shi Y., Zhou L., Tian J., Wang Y.(2011).Transplanting neural stem cells in nerve conduit to promote rats facial nerve regeneration: Journal of Clinical otorhinolaryngology ,head and neck sugiery, v.26,p.1040-2.

Shim K.S., Lubec G. (2002). Drebrin, a dendritic spine protein, is manifold decreased in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome: Neuroscience Letters, v. 324, p. 209-12.

Shimazu K., Zhao M., Sakata K., Akbarian S., Bates B. Jaenisch R., Lu B. (2006) NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis: Learning and Memory, v.3, p.307-15.

Shott S.R. (2006). Down syndrome: common otolaryngologic manifestations. Americal Journal of Medical Genetic Part C Seminary of Medical Genetic: v. 142C, p.131-40.

Shytle RD., Bickford PC., Rezai-zadeh K., Hou L., Zeng J, Tan J., Sanberg PR., Sanberg CD., Roschek B Jr., Fink RC., Alberte RS. (2009). Optimized turmeric extracts have potent anti-amyloidogenic effects: Curring Alzheimer research, v.6, p.564-71.

Siarey R.J., Carlson E.J., Epstein C.J., Balbo A., Rapoport S.I., Galdzicki Z. (1999). Increased synaptic depression in the Ts65Dn mouse, a model for mental retardation in Down syndrome: Neuropharmacology, v.38, p.1917-20.

Siarey R.J., Kline-Burgess A., Cho M., Balbo A., Best T.K., Harashima C., Klann E., Galdzicki Z. (2006). Altered signaling pathways underlying abnormal hippocampal synaptic plasticity in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: Journal of Neurochemestry, v.98, p.1266-77.

Siarey R.J., Stoll J., Rapoport S.I., Galdzicki Z. (1997). Altered long-term potentiation in the young and old Ts65Dn mouse, a model for Down Syndrome: Neuropharmacology, v.36, p.1549-54.

Smigielska-Kuzia J., Boćkowski L., Sobaniec, W., Kułak W., Sendrowski K. (2010). Amino acid metabolic processes in the temporal lobes assessed by proton magnetic resonance spectroscopy (1H MRS) in children with Down syndrome: Pharmacology Reports, v. 62, p.1070-7.

Smigielska-Kuzia J., Sobaniec W. (2007). Brain metabolic profile obtained by proton magnetic resonance spectroscopy HMRS in children with Down syndrome: Advances in medical sciences, v.1, p.183-7.

Snider W.D. (1994). Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us: Cell, v.77, p. 627-38.

Sommer C.A., Pavarino-Bertelli E.C., Goloni-Bertollo E.M., Henrique-Silva F. (2008). Identification of dysregulated genes in lymphocytes from children with Down syndrome: Genome, v. 51, p.19-29.

Song WJ., Sternberg LR., Kasten-Sportès C., Keuren ML., Chung SH., Slack AC., Miller DE., Glover TW., Chiang PW., Lou L. (1996). Kurnit DM Isolation of human and murine homologues of the Drosophila minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome "critical region": v.38, p331-9.

Stagni F., Giacomini A., Guidi S., Ciani E., Ragazzi E., Filonzi M., De Iasio R., Rimondini R., Bartesaghi. (2015). Long-term effects of neonatal treatment with fluoxetine on cognitive performance in Ts65Dn mice: neurobiology disorders, v.74, p.204-18.

Stein V., House D. R., Bredt D.S. (2003). Postsynaptic density-95 mimics and occludes hippocampal long-term potentiation and enhances long-term depression: Journal of neurociscience, v.2, p.5503-06.

Sternfeld F., Carling R.W., Jelley R.A., Ladduwahetty T., Merchant K.J., Moore K.W., Reeve A.J., Street L.J., O'Connor D., Sohal B., Atack J.R., Cook S., Seabrook G., Wafford K., Tattersall F.D., Collinson N., Dawson G.R., Castro J.L., MacLeod A.M. (2004). Selective, orally active gamma-aminobutyric acidA alpha5 receptor inverse agonists as cognition enhancers: Journal of medicinal chemistr Merschman S.A., Rose M.J., Pearce G.E., Woolf E.J., Schaefer B.H., Huber A.C., Musson D.G., Perry K.J., Rush D.J., Varsolona R.J., Matuszewski B.K. (2005). Characterization of the solubility of a poorly soluble hydroxylated metabolite in human urine and its implications for potential renal toxicity: Pharmazie, v.60, p.359-63. y v.47, p.2176-9.

Stewart L.S., Persinger M.A., Cortez M.A., Snead O.C. (2007). Chronobiometry of behavioral activity in the Ts65Dn model of Down syndrome: Behavior Genetics, v.37, p.388-98.

Stillwell W., Wassall SR. (2003). Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid: Chemistry and Physics of Lipids, v.126, p.1-27.

Stokes P.R., Myers J.F., Kalk N.J., Watson B.J., Erritzoe D., Wilson S.J., Cunningham V.J., Riano R.D., Hammers A., Turkheimer F.E., Nutt D.J., Lingford-Hughes A.R.(2014).Acute increase in synaptic GABA detectable in the living human brain: a [^{11}C]Ro154513 PET study: Neuroimage, v.99,p.158-65, doi: 10.1016/j.neuroimage.2014.05.035. Epub 2014 May 17.

Sturgeon X., Gardiner K.J. (2011). Transcript catalogs of human chromosome 21 and orthologous chimpanzee and mouse regions: Mammalian Genome, v.22, p.261-71.

Suetsugu M., Mehraein P. (1980). Spine distribution along the apical dendrites of the pyramidal neurons in Down's syndrome. A quantitative Golgi study. Acta Neuropathology, v. 50, p.207-210.

Sultan M., Piccini I., Balzereit D., Herwig R., Saran N.G., Lehrach H., Reeves R.H., Yaspo M.L. (2007). Gene expression variation in Down's syndrome mice allows prioritization of candidate genes: Genome Biology, v. 8, p.91.

Tabernero A., Lavado E.M., Granda B., Velasco A., Medina J.M.(2001). Neuronal differentiation is triggered by oleic acid synthesized and released by astrocytes: Journal of Neurochemical, v.79, p.606-16.

Takashima S., Iida K., Mito T., Arima M. (1994). Dendritic and histochemical development and ageing in patients with Down's syndrome: Journal Intellectual Disability Research, v. 38 (Pt 3), p.265-73.

Takashima S., Leshima A., Nakamura H., Becker L.E. (1989). Dendrites, dementia and the Down syndrome: Brain & development, v.11, p. 131-33.

Takebayashi H., Yoshida S., Sugimori M., Kosako H., Kominami R., Nakafuku M., Nabeshima Y. (2000). Dynamic expression of basic helix-loop-helix Olig family members: implication of Olig2 in neuron and oligodendrocyte differentiation and identification of a new member, Olig3: Mechanisms of development, v.99, p.143-8.

Tanabe Y., Hashimoto M ., Sugioka K ., Maruyama M ., Fujii Y., Hagiwara R., Hara T., Hossain S. M ., Shido O.(2014). Improvement of spatial cognition with dietary docosahexaenoic acid is associated with an increase in Fos expression in rat CA1 hippocampus: Clinical and Experimental pharmacology and physiology, v.10, p.700-3.

Tang M., Zhang M., Cai W., Li H., Jiang P., Dang R., Liu Y., Xin E., Xue Y., Cao L., Wu Y. (2016). Maternal diet of polyunsaturated fatty acid altered the cell proliferation in the dentate gyrus of hippocampus and influenced glutamatergic and serotoninergic systems of neonatal female rats: Lipids in Heads and Disease., v.15, doi: 10.1186/s12944-016-0236-1.

Teichmann M., Dupoux, E., Kouider S., Bachoud-Lévi A.C. (2006). The role of the striatum in processing language rules: evidence from word perception in Huntington's disease. Journal Cognitive Neuroscience, v. 18, p.1555-69.

Teipel S.J., Alexander G.E., Schapiro M.B., Möller H.J., Rapoport S.I., and Hampel H. (2004). Age-related cortical grey matter reductions in non-demented Down's syndrome adults determined by MRI with voxel-based morphometry: Brain, v. 127, p. 811-24.

Teipel S.J., Hampel H. (2006). Neuroanatomy of Down syndrome in vivo: a model of preclinical Alzheimer's disease: Behavior Genetic, v. 36, p. 405-15.

Teipel S.J., Schapiro M.B., Alexander G.E., Krasuski J.S., Horwitz, B., Hoehne C., Möller H.J., Rapoport S.I., Hampel H. (2003). Relation of corpus callosum and hippocampal size to age in nondemented adults with Down's syndrome: American Journal of Psychiatry, v.160, p.1870-78.

Tiwari SK1., Agarwal S., Seth B., Yadav A., Nair S., Bhatnagar P., Karmakar M., Kumari M., Chauhan LK., Patel DK., Srivastava V., Singh D., Gupta SK., Tripathi A., Chaturvedi RK., Gupta KC. (2011). Curcumin-loaded nanoparticles potently induce adult neurogenesis and reverse cognitive deficits in Alzheimer's disease model via canonical Wnt/β-catenin pathway: ACS Nano, v.8, p.76-103.

Tixier-Vidal A., Picart R., Loudes C., Bauman A.F. (1986). Effects of polyunsaturated fatty acids and hormones on synaptogenesis in serum-free medium cultures of mouse fetal hypothalamic cells: Neuroscience, 17:115-32.

Toiber D., Azkona G., Ben-Ari S., Torán N., Soreq H., Dierssen M., (2010). Engineering DYRK1A overdosage yields Down syndrome-characteristic cortical splicing aberrations: Neurobiology of Disease, v. 40, p.348-59.

Trazzi S., Fuchs C., De Franceschi M., Mitrugno V.M., Bartesaghi R., Ciani E. (2014). APP-dependent alteration of GSK3β activity impairs neurogenesis in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: Neurobiology Disease, v.67, p.24-36, doi:10.1016/j.nbd.2014.03.003. Epub 2014 Mar 15.

Trazzi S., Fuchs C., Valli E., Perini G., Bartesaghi R., Ciani E. (2013). The amyloid precursor protein (APP) triplicated gene impairs neuronal precursor differentiation and neurite development through two different domains in the Ts65Dn mouse model for Down syndrome: Journal Biologycal Chemical, v.288, p. 20817-29. doi: 10.1074/jbc.M113.451088. Epub 2013 Jun 5.

Trazzi S., Mitrugno V.M., Valli E., Fuchs C., Rizzi S., Guidi S., Perini G., Bartesaghi R., Ciani E. (2011). APP-dependent up-regulation of Ptch1 underlies proliferation impairment of neural precursors in Down syndrome: Human Molecular Genetics, v.20, p.1560-73.

Trillo L., Das D., Hsieh W., Medina B., Moghadam S., Lin B., Dang V., Sanchez M.M., De Miguel Z., Ashford J.W., Salehi A. (2013). Ascending monoaminergic systems alterations in Alzheimer's disease. Translating basic science into clinical care: Neuroscience and biobehavioral reviews, v.37, p.1363-79.

Troca-Marín J.A., Alves-Sampaio A., Montesinos M.L. (2011). An increase in basal BDNF provokes hyperactivation of the Akt-mammalian target of rapamycin pathway and deregulation of local dendritic translation in a mouse model of Down's syndrome: Journal of Neuroscience, v.31, doi:10.1523 / JNEUROSCI.0011-11.2011

Uittenbogaard M., Baxter K.K., Chiaramello A. (2010). NeuroD6 genomic signature bridging neuronal differentiation to survival via the molecular chaperone network:Journal Neuroscience research,v88,p.33-54.

Ullah F., Liang A., Rangel A., Gyengesi E., Niedermayer G., Münch,G. (2017).High bioavailability curcumin: an anti-inflammatory and neurosupportive bioactive nutrient for neurodegenerative diseases characterized by chronic neuroinflammation: Archives of Toxicology, doi: 10.1007 / s00204-017-1939-4.

Vacca, R.A., Valenti, D. (2015). Green tea EGCG plus fish oil omega-3 dietary supplements rescue mitochondrial dysfunctions and are safe in a Down's syndrome child: Clinical Nutrition, v.34, p.783-4.

Valenti D., de Bari L., De Filippis B., Henrion-Caude A., Vacca R.A. (2014). Mitochondrial dysfunction as a central actor in intellectual disability-related diseases: an overview of Down syndrome, autism, Fragile X and Rett syndrome: Neuroscience Biobehavioral Review, v. 46, doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.01.012.

Valenti D., Manente G.A., Moro L., Marra E., Vacca R.A. (2011). Deficit of complex I activity in human skin fibroblasts with chromosome 21 trisomy and overproduction of reactive oxygen species by mitochondria: involvement of the cAMP/PKA signalling pathway: Biochemical Journal, v. 435, p.679-88.

Vangaveti V.N., Jansen H., Kennedy R.L., Malabu U.H. (2016). Hydroxyoctadecadienoic acids: Oxidised derivatives of linoleic acid and their role in inflammation associated with metabolic syndrome and cancer: European Journal Pharmacology, v.785, p.70-6.

Velasco A., Tabernero A., Medina J.M. (2003). Role of oleic acid as a neurotrophic factor is supported in vivo by the expression of GAP-43 subsequent to the activation of SREBP-1 and the up-regulation of stearoyl-CoA desaturase during postnatal development of the brain: Brain research, v.977, p.103-11.

Velazquez R., Ash J.A., Powers B.E., Kelley C.M., Strawderman M., Luscher Z.I., Ginsberg S.D., Mufson E.J., Strupp B.J.(2013). Maternal choline supplementation improves spatial learning and adult hippocampal neurogenesis in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: Neurobiology Disease, v. 58, p. 92-101, doi: 10.1016/j.nbd.2013.04.016. Epub 2013 Apr 30.

Venault P., Chapouthier G. (2007). From the behavioral pharmacology of beta-carbolines to seizures, anxiety, and memory: ScientificWorldJournal, v.7, p.204-23.

Venault P., Chapouthier G., Simiand J., Dodd R.H., Rossier J. (1987). Enhancement of performance by methyl beta-carboline-3-carboxylate, in learning and memory tasks: Brain Research Bulletin, v.19, p.365-70.

Venna V.R., Deplanque D., Allet C., Belarbi K., Hamdane M., Bordet R. (2009). PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus: Psychoneuroendocrinology, v.39, p.199-211.

Vicari S., Bellucci S., Carlesimo G.A. (2000). Implicit and explicit memory: a functional dissociation in persons with Down syndrome: Neuropsychologia, v.38, p.240-51.

Vidal. (2017). Efecto de la reducción de la inhibición mediada por los receptores $GABA_A\alpha5$ y $GABA_B$/GIRK2 sobre las alteraciones funcionales y neuromorfológicas en un modelo de SD. (Tesis doctoral). Universidad de Cantabria, Santander, España.

Vijayalaxmi. (1980). Genetic effects of turmeric and curcumin in mice and rats: Mutation Research/Genetic Toxicology, v.79, p.125-32.

Villar A.J., Belichenko P.V., Gillespie A.M., Kozy H.M., Mobley W.C., Epstein C.J. (2005). Identification and characterization of a new Down syndrome model, Ts[Rb(12.1716)]2Cje, resulting from a spontaneous Robertsonian fusion between T(171)65Dn and mouse chromosome 12: Mammalian genome, v.16, p.79-90.

Vink J., Incerti M., Toso L., Roberson R., Abebe D., Spong C.Y. (2009). Prenatal NAP+SAL prevents developmental delay in a mouse model of Down syndrome through effects on N-methyl-D-aspartic acid and gamma-aminobutyric acid receptors: American Journal of Obstetrics & Gynecology 200, v.524, p. e521-24.

Visu-Petra L., Benga O., Tincaş I., Miclea M. (2007). Visual-spatial processing in children and adolescents with Down's syndrome: a computerized assessment of memory skills. Journal Intellectual Disability Research: v. 51, p.942-52.

Voigtländer T., Vogel F. (1985). Low alpha-fetoprotein and serum albumin levels in Morbus Down may point to a common regulatory mechanism: Human genetic v.71, p.276-7.

Vuksić M., Petanjek Z., Rasin M.R., Kostović I. (2002). Perinatal growth of prefrontal layer III pyramids in Down syndrome: Pediatric Neurology, v. 27, p.36-38.

Vuksić, M., Petanjek, Z., Rasin, M.R., and Kostović, I. (2002). Perinatal growth of prefrontal layer III pyramids in Down syndrome. Pediatr Neurol 27, 36-38.

Wainwright A., Sirinathsinghji D., Oliver K.R. (2000). Expression of GABA (A) receptor alpha5 subunit-like immunoreactivity in human hippocampus: Molecular brain research, v.80, p.228-32.

Wang K.C., Kim J.A., Sivasankaran R., Segal R., He Z. (2002). P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp: Nature, v.420, p.74-8.

Wang Y., Yin H., Wang L., Shuboy A., Lou J., Han B., Zhang X., Li J.(2013). Curcumin as a potential treatment for Alzheimer's disease: A study of the effects of curcumin on hippocampal expression of glial fibrillary acidic protein: American Journal Chinesse Medical, v.41, p.59-70.

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 Neural Transmission SupWisniewski K.E., Schmidt-Sidor B. (1989). Postnatal delay of myelin formation in brains from Down syndrome infants and children: Clinical neuropathology, v.8, p.55-62. suplementum, v.61, p.59-70.

Wenger G.R., Schmidt C., Davisson M.T. (2004). Operant conditioning in the Ts65Dn mouse: learning: Behav Genet, v.34, p.105-119.

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: European Journal of Pharmacology, v. 402, p.77-85.

Wetmore D.Z., Garner C.C. (2010). Emerging pharmacotherapies for neurodevelopmental disorders: Journal of developmental and behavioral pediatrics, v.31, p. 564-81.

Whitaker-Azmitia P.M. (2001). Serotonin and brain development: role in human developmental diseases: Brain research bulletin, v.56, p. 479-85.

Whitney K.N., Wenger G.R. (2013). Impulsivity and motor activity in aged, male Ts65Dn mice: Experiment Clinic of Psychopharmacology v. 21, p. 345-54.

Whittle N., Sartori S.B., Dierssen M., Lubec G., Singewald N. (2007). Fetal Down syndrome brains exhibit aberrant levels of neurotransmitters critical for normal brain development: Pediatrics, v.120, p.1465-71

Wilcock D.M., Griffin W.S. (2013). Down's syndrome, neuroinflammation, and Alzheimer neuropathogenesis: Journal Neuroinflammation, v.10, p.84.

Williams K.R., Wishart J.G., Pitcairn T.K., Willis D.S. (2005). Emotion recognition by children with Down syndrome: investigation of specific impairments and error patterns: American Journal of mental retard v.110, p.378-92.

Wishart J.G. (2007). Socio-cognitive understanding: a strength or weakness in Down's syndrome? Journal Intellectual Disability Research, v. 51, p.996-1005.

Wisniewski H. M., Rabe A. (1986). Discrepancy between Alzheimer-type neuropathology and dementia in persons with Down's syndrome: Annals of the New York Academy of Sciences, v.477, p.247-60.

Wisniewski K.E., Bobinski M. (1991). Hypothalamic abnormalities in Down syndrome: Progress Clinical Biologycal Resarch, v. 373, p.153-67.

Wisniewski K.E., Laure-Kamionowska M., Wisniewski HM. (1984). Evidence of arrest of neurogenesis and synaptogenesis in brains of patients with Down's syndrome: The New England the journal of Medicine, v.311, doi: 10.1056/NEJM198411013111818.

Wu C., Sun D. (2015). GABA receptors in brain development, function, and injury: Metabolic brain disease, v.30, p.367-79.

Wurtman RJ, Ulus IH, Cansev M, et al. (2006). Synaptic proteins and phospholipids are increased in gerbil brain by administering uridine plus docosahexaenoic acid orally. Brain Research, v.1088, p.83-92.

Xu Y., Ku B., Cui, L., Li X., Bearish, P.A., Foster, T.C., Ogle W.O. (2007). Curcumin reverses impaired hippocampal neurogenesis and increases serotonin receptor 1A mRNA and brain-derived neurotrophic factor expression in chronically stressed rats: Brain research, v.1182, p. 9-18.

Xue M., Liu J.P., Yang H.Y., Suo Z.W., Yang X., Hu X.D. (2017). Inhibition of a5 subunit-containing $GABA_A$ receptors facilitated spinal nociceptive transmission and plasticity: European Journal of Pain, doi:10.1002/ejp.1009.

Xue M., Stradomska A., Chen H., Brose N., Zhang W., Rosenmund, C., Reim, K. (2008). Complexins facilitate neurotransmitter release at excitatory and inhibitory synapses in mammalian central nervous system: Proceedings of the National Academy of Science of America, doi: 10.1073/pnas.0803012105.

Yamada J., Furukawa T., Ueno S., Yamamoto S., Fukuda A. (2007). Molecular basis for the GABAA receptor-mediated tonic inhibition in rat somatosensory cortex: Cerebral Cortex, v.17, p.1782-87.

Yamada M., Inanobe A., Kurachi Y. (1998). G protein regulation of potassium ion channels: Pharmacological Reviews, v.50, p.723-60.

Yang C, Zhang X, Fan H, Liu Y. (2009). Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia: Brain research, v.28, p.133-41.

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: The Journal of Biologycal Chemistry v.276, p.39819-24.

Yates C.M., Simpson J., Gordon A. (1986). Regional brain 5-hydroxytryptamine levels are reduced in senile Down's syndrome as in Alzheimer's disease: Neuroscience Letters, v.65, p.189-92.

Yee B.K., Hauser J., Dolgov V.V., Keist R., Möhler H., Rudolph U., Feldon J. (2004). GABA receptors containing the alpha5 subunit mediate the trace effect in aversive and appetitive conditioning and extinction of conditioned fear: European Journal of Neuroscience, v.20, p.1928-36.

Yehuda S., Rainovitz S., Mostofsky D.I. (1997) Effects of essential fatty acids preparation, (SR-3) on brain biochemistry and on behavioral and cognitive functions: European Journal of Pharmacology, v.328, p.23-9.

Yoder P., Woynaroski T., Fey M., Warren S. (2014). Effects of dose frequency of early communication intervention in young children with and without Down syndrome: American Journal Intellectual Development Disability: v.119, p.17-32.

Ypsilanti A., Grouios G., Alevriadou A., Tsapkini K. (2005). Expressive and receptive vocabulary in children with Williams and down syndromes: Journal Intellectual Disability Research, v. 49, p.353-64.

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

Zampini L., D'Odorico L. (2011). Lexical and syntactic development in Italian children with Down's syndrome: International Journal Lang Commun Disorders, v. 46, p. 386-96.

Zhou H., Beevers C.S., Huang, S. (2011). The targets of curcumin: Current Drug`s Targets, v.12, p.332-47.

Zhou J., Miao H., Li X., Hu Y., Sun H., Hou Y. (2017). Curcumin inhibits placental inflammation to ameliorate LPS-induced adverse pregnancy outcomes in mice via upregulation of phosphorylated Akt: Inflammacion research, v.76, p. 175-85.

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

Zigman W.B., Lott I.T. (2007). Alzheimer's disease in Down syndrome: neurobiology and risk: Mental Retard Development of Disability Research Review, v. 13, p.237-46.

Zmijewski P.A., Gao L.Y., Saxena A. R, Chavannes N.K., Hushmendy S.F., Bhoiwala DL., Crawford D.R. (2015). Fish oil improves gene targets of Down syndrome in C57BL and BALB/c mice: Nutrition research, v.35, p.440-8.