



Universidad de Cantabria

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología y Farmacología

**Estudio de los efectos protectores del
tratamiento crónico con melatonina sobre
los déficits cognitivos del ratón Ts65Dn,
un modelo de síndrome de Down**

**Tesis doctoral presentada por Andrea Corrales Pardo para optar al
Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria**

Santander, Julio 2015



Universidad de Cantabria
Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología y Farmacología

Dña. Noemí Rueda Revilla, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICA:

Que **Dña. Andrea Corrales Pardo** ha realizado bajo mi dirección el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado: "Estudio de los efectos protectores del tratamiento crónico con melatonina sobre los déficits cognitivos del ratón Ts65Dn, un modelo de síndrome de Down".

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

Santander, 17 de julio de 2015.

Fdo. Noemí Rueda Revilla

Para la realización de esta tesis he disfrutado entre los años 2010 y 2014 de una beca del programa de Formación del Profesorado Universitario (FPU) otorgada por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Este trabajo ha sido financiado por:

- Fundación Jérôme Lejeune
- Fundación Marqués de Valdecilla - IFIMAV

Agradecimientos

Me encuentro sentada en frente del ordenador y mi cabeza viaja unos años atrás...era una recién licenciada que quería probar suerte en esto de la ciencia...Tenía muy claro lo que quería hacer y no lo pensé dos veces, después de algún que otro correo con mi compatriota Alejandro Ontalvilla, al que agradezco enormemente su ayuda los meses previos a decidir dónde realizar mi Tesis, tomé la acertada decisión de empezar a desarrollarla en el departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina.

A lo largo de este periodo he disfrutado, reído, llorado...una mezcla de emociones en toda regla, pero afortunadamente, el sentimiento que me hinunda ahora al hacer balance de todos estos años es de felicidad y satisfacción.

Realizar una Tesis Doctoral es como hacer una carrera de montaña, en definitiva, es como la vida misma condensada en muy poco tiempo, pasas por muchos y diferentes estados anímicos y físicos. Hay momentos en los que vas a buen ritmo, con buenas sensaciones y crees que vas a llegar rápido al final, sin embargo, otras veces te vienes abajo y todo se hace cuesta arriba, pero al final, si no tiras la toalla, siempre alcanzas la meta con una sonrisa y una gran satisfacción personal.

Muchas son las personas que han estado conmigo a lo largo de esta etapa, tanto en el ámbito personal como profesional y, sin lugar a dudas, gracias a su apoyo incondicional y a su impecable trabajo, he llegado a la línea de meta con la sensación de haber hecho un buen trabajo. A todas ellas, quiero agradecerles de corazón su apoyo y cariño durante estos años.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis compañeras de laboratorio. A **Paula**, por ayudarme siempre que lo he necesitado, por su predisposición, a **Vero**, por ser una gran compañera de trabajo, por su buen humor y porque siempre me saca una sonrisa y a **Su**, por su dulzura, por sus conversaciones científicas y no científicas, por sus consejos, gracias a las tres. También quiero agradecerle a **Eva** su valiosa y gran ayuda a lo largo de toda la tesis, por realizar un trabajo excelente y estar siempre dispuesta a echar una mano. Asimismo, a **Sara**, **Marian** y **Eduardo** les doy las gracias por sus ánimos siempre que hemos coincidido en el laboratorio. Por supuesto, quiero destacar y reconocer la labor de **Carmen Martínez-Cué**, una trabajadora incansable. Su ayuda y consejos prestados a lo largo de esta tesis han sido determinantes. Es digno de admirar su entrega al mundo de la ciencia.

De manera especial, quiero mostrar mi agradecimiento a mis compañeras de despacho **Ali** y **Carol**, ya que siempre me han echado un cable cuando lo he necesitado, porque siempre

se han portado muy bien conmigo. Muchas gracias Ali por ayudarme en el laboratorio al inicio de esta etapa y tu siempre predisposición a lo largo de estos años. Gracias a las dos por amenizar las mañanas y las tardes en el ordenador y hacerlas más llevaderas. Y por supuesto a **Vir**, con la que he pasado mucho tiempo en el despacho y fuera de él y a la que guardo un gran cariño. Gracias a las tres por ser muy buenas compañeras.

También me gustaría mostrar mi agradecimiento al resto de compañeros del área de Fisiología: **Samuel Cos**, **Carlos Martínez-Campa**, **M^a José Noriega**, **Mar San Martín** y **José Antonio Cos**, por ser unos muy buenos profesionales y tenderme la mano siempre. Y hacer una especial mención a **Gema**, por su dedicación y ayuda en el laboratorio.

Quiero agradecer profundamente a **Emilio Sánchez-Barceló** y a **Dolores Mediavilla** sus valiosos consejos y el apoyo prestado a lo largo de la tesis y después. Gracias por confiar en mí, por vuestro cariño y por hacerme sentir especial. Es admirable vuestra entrega a la profesión.

Asimismo, quiero agradecer a **M^a Amor Hurlé** y a todo su equipo, su generosidad y su acogimiento. A **Ana Villar**, **Nieves**, **Aquilino**, **David**, **Raquel** y **Sara** por ser tan buenos compañeros y por su inmensa amabilidad.

Por otro lado, quiero mostrar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido en mayor o menor medida a la realización de esta Tesis Doctoral. Gracias al equipo de **Ángel Pazos** y en particular, a **Rebeca Vidal** por enseñarme todo lo que sé sobre electrofisiología. Ha sido un placer trabajar contigo y te agradezco enormemente tu paciencia y dedicación. A **Álvaro Díaz** y a **Elsa Valdizán** por dejarme usar sus aparatos y el laboratorio de conducta siempre que lo he necesitado. Y a **Rebeca Madureira** por ayudarme en mis comienzos con el western.

Quiero agradecer a **Víctor M. Campa** su ayuda prestada con el microscopio confocal. Es todo un lujo poder aprender de gente tan cualificada.

No puedo dejar de mencionar a mis compañeros del SEEA, en especial a **Mar**, **Marta** y **Lourdes** por haber mantenido la colonia durante todos estos años y por su accesibilidad y buena labor realizada con los animales.

Por supuesto, quiero hacer mención a mis compañeros becarios que al igual que yo han decidido emprender este viaje y con los que he compartido algún que otro momento a lo largo

de estos años tanto dentro como fuera del edificio. A **Lolo, Ana, Mari Carmen**, que fueron las primeras personas que conocí y a **Nacho**, con el que es un placer siempre charlar.

A lo largo de esta etapa de mi vida muchas personas fuera del laboratorio me han mostrado su confianza y apoyo y han hecho que estos años en Santander sean inolvidables. Gracias a todo mi grupo de entrenamiento de La Albericia y a mi entrenador **Ramón Torralbo** por los buenos momentos que hemos vivido. Por las risas durante los entrenamientos y las largas charlas en el complejo. En especial, gracias a **Mario, Héctor, Santi, María y Abascal** por ser, además de grandes atletas, unas grandísimas personas. Como no mencionar a mi “hermana pequeña” **Inés**, que además de compañera de entrenamientos ha sido la mejor compañera de piso que he tenido y una gran amiga. Y a **Noelia**, uno de los mayores tesoros que me ha regalado esta ciudad. Gracias a todos vosotros por valorarme y por todos los momentos que hemos compartido.

Por supuesto, a todas mis amigas y amigos de mi cuadrilla de Castro. A **Silvia, Maitane, Ane, Esti, Merino, Alcón, Ana, Rebe, Daniela, Álvaro**, gracias por vuestro apoyo incondicional, los cafés, las cañas, los paseos, las fiestas, las charlas, los consejos, las risas, las lágrimas, todo. Y especialmente a **Rubén**, que me ha acompañado durante todo este camino y ha sido uno de mis mayores apoyos en los buenos y en los malos momentos. A todos y cada uno de vosotros, os quiero.

Me siento inmensamente afortunada por haber tenido la oportunidad de compartir el último año con personas y profesionales de la talla de **Antonio Bores, Mireia Peláez, Patricia Casas, David Casamichana, Jorge Crespo, Silvia Aparicio, Ángela del Barrio, Nacho Velasco y Cristian Abelairas**. Muchas gracias por vuestra ayuda, no os podéis imaginar lo que os aprecio y las fuerzas que me habéis transmitido durante los últimos meses de elaboración de esta Tesis.

Voy a ir acabando el turno de agradecimientos y quería dejar para el final al pilar fundamental de esta tesis. Me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento a mi directora de tesis **Noemí Rueda Revilla**, por haberme ofrecido la posibilidad de desarrollar este trabajo de investigación y por transmitirme su pasión por la ciencia. He aprendido mucho tanto a nivel personal como a nivel profesional a tu lado y has sido un apoyo muy grande para mí. Noe, gracias por tu implicación y tu paciencia, eres una luchadora y a pesar de las adversidades nunca te vienes abajo. Por todo ello, ha sido un verdadero placer trabajar contigo.

Y ya para terminar y no por ello menos importante, quiero expresar mi más profundo amor y respeto a las dos personas que siempre me acompañan de forma incondicional en cada momento de mi vida, **mis padres**. Sois un ejemplo a seguir y todo lo que soy es en gran parte gracias a vosotros, a la sabiduría que me transmitís día a día y al corazón tan grande que tenéis. Os quiero.

A mis padres

“En lo alto de una montaña se encuentra la libertad. Porque para subir has tenido que luchar, has descubierto que somos ínfimos en comparación con lo que nos rodea”

KILIAN JORNET

Índice

ABREVIATURAS	27
INTRODUCCIÓN.....	33
1. EL SÍNDROME DE DOWN	33
1.1. Origen de la trisomía 21	33
1.2. El cromosoma 21 humano: descripción y relación con el síndrome de Down.....	34
1.3. Características fenotípicas del síndrome de Down	34
1.4. Características generales del síndrome de Down	35
1.5. Neurobiología del síndrome de Down	36
1.5.1. Alteraciones morfológicas del SNC.....	36
1.5.2. Alteraciones neuroquímicas	39
1.5.3. Alteraciones electrofisiológicas.....	40
1.5.4. Alteraciones en los sistemas cognitivos	41
1.6. La neurodegeneración en el síndrome de Down	44
1.6.1. Aumento del estrés oxidativo cerebral y envejecimiento precoz	44
1.6.2. Neuropatología de tipo Alzheimer	45
1.6.3. La degeneración colinérgica en el síndrome de Down	48
1.6.4. La neuroinflamación en el síndrome de Down	48
2. MODELOS MURINOS DE SÍNDROME DE DOWN	49
2.1. Modelos trisómicos para genes del MMU16, MMU17 y MMU10	49
2.2. Modelos transcromosómicos (HSA21)	54
2.3. Modelos transgénicos	54
3. EL RATÓN Ts65Dn COMO MODELO DE SÍNDROME DE DOWN	54
3.1. Alteraciones neuromorfológicas	55
3.2. Alteraciones en la neurogénesis	57
3.3. Alteraciones en la conectividad sináptica	58
3.4. Desequilibrio en el balance excitación-inhibición cerebral: el papel del GABA y el glutamato ...	58
3.5. Alteraciones en la plasticidad sináptica y en la LTP	60
3.6. Neurodegeneración	61
3.7. Alteraciones cognitivas y conductuales	62
4. LA MELATONINA.....	63
4.1. Síntesis, secreción, circulación y metabolismo de la melatonina	63
4.2. Receptores de melatonina	66
4.3. Acciones de la melatonina	66

OBJETIVOS	73
MATERIAL Y MÉTODOS	77
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	77
2. GENOTIPADO DE LOS RATONES	77
2.1. Preparación de las muestras: extracción de DNA genómico de cola de ratón	78
2.2. PCR cuantitativa a tiempo real	78
2.3. PCR estándar para la identificación del gen <i>Rd</i>	79
3. GRUPOS EXPERIMENTALES Y ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA	81
4. ESTUDIOS CONDUCTUALES	84
4.1. Pruebas sensorimotoras.....	84
4.2. Actividad general y ansiedad: campo abierto y laberinto elevado en cruz.....	88
4.3. Atención y actividad exploratoria: tabla de agujeros.....	90
4.4. Aprendizaje y memoria: laberinto acuático de Morris y prueba de condicionamiento del miedo	91
5. REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD NEURONAL DEL HIPOCAMPO: POTENCIACIÓN A LARGO PLAZO	95
6. ESTUDIOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA	98
6.1. Preparación de tejidos	98
6.2. Tinción de Nissl.....	98
6.3. Técnicas de inmunohistoquímica	100
6.4. Recuentos celulares y técnicas estereológicas.....	104
6.4.1. <i>Cuantificación de la proliferación celular en la zona subgranular del giro dentado</i>	104
6.4.2. <i>Cuantificación de distintas poblaciones de neuronas inmaduras en proceso de diferenciación en el giro dentado</i>	104
6.4.3. <i>Cuantificación de neuronas granulares maduras en el giro dentado</i>	106
6.4.4. <i>Cuantificación de botones Glutamatérgicos y GABAérgicos en la capa molecular del giro dentado</i>	106
6.4.5. <i>Cuantificación de neuronas colinérgicas en el septo medial del prosencéfalo basal</i>	107
7. INMUNODETECCIÓN DE APP MEDIANTE WESTERN BLOT	107
8. ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA).....	110
8.1. Inmunodetección de los péptidos amiloides A β 1-40 y A β 1-42 en el hipocampo y la corteza cerebral	111
8.2. Inmunodetección de 4-hidroxinonenal en hipocampo y corteza cerebral	112
8.3. Cuantificación de los niveles del metabolito 6-sulfatoximelatonina en orina: ensayo por inmunoadsorción competitiva	112

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	113
RESULTADOS.....	117
1. ESTUDIO I: Efectos del tratamiento crónico con melatonina durante la edad adulta sobre las alteraciones comportamentales, cognitivas, neuromorfológicas y electrofisiológicas y sobre la neurodegeneración del ratón Ts65Dn.....	117
1.1. Análisis de los niveles de melatonina en orina.....	117
1.2. Efectos sobre la cognición, ansiedad, atención y habilidades sensorimotoras del ratón TS	117
1.2.1. Cognición.....	117
1.2.1.1. Prueba de condicionamiento del miedo.....	117
1.2.1.2. Laberinto acuático de Morris.....	119
1.2.2. Ansiedad y actividad general	123
1.2.2.1. Campo abierto	123
1.2.2.2. Laberinto elevado en cruz.....	124
1.2.3. Actividad exploratoria y atención: Tabla de agujeros.....	126
1.2.4. Habilidades sensorimotoras.....	127
1.2.4.1. Batería de pruebas sensorimotoras	127
1.2.4.2. Actividad espontánea: Actimetría	128
1.2.4.3. Coordinación motora: Rotarod	129
1.3. Efectos de la melatonina sobre las alteraciones neuromorfológicas: neurogénesis hipocampal.....	130
1.3.1. Efectos sobre la densidad de neuronas granulares maduras en el giro dentado	130
1.3.2. Efectos sobre la proliferación celular y sobre la diferenciación neuronal en la zona subgranular del hipocampo	131
1.4. Efectos de la melatonina sobre las alteraciones en la conectividad y plasticidad sináptica del hipocampo	134
1.4.1. Efectos sobre la densidad de botones sinápticos GABAérgicos y glutamatérgicos en la capa molecular de giro dentado: balance inhibición/excitación	134
1.4.2. Efectos sobre la plasticidad sináptica neuronal del hipocampo: potenciación a largo plazo.....	136
1.5. Efectos de la melatonina sobre distintos procesos implicados en la neurodegeneración cerebral	138
1.5.1. Efectos sobre la degeneración del sistema colinérgico del septo medial del prosencéfalo basal	138
1.5.2. Efectos sobre el desarrollo de la neuropatología de tipo Alzheimer: niveles de expresión de la proteína APP y de los péptidos neurotóxicos β -amiloides en la corteza e hipocampo	139
1.5.3. Efectos sobre los niveles de estrés oxidativo en la corteza y en el hipocampo.....	140

2. ESTUDIO II: Efectos del tratamiento crónico con melatonina durante las etapas pre- y post-natales sobre las alteraciones comportamentales y cognitivas del ratón Ts65Dn	142
2.1. Efectos sobre la cognición, ansiedad, atención y habilidades sensorimotoras del ratón TS	142
2.1.1. <i>Cognición</i>	142
2.1.1.1. <i>Prueba de condicionamiento del miedo</i>	142
2.1.1.2. <i>Laberinto acuático de Morris</i>	143
2.1.2. <i>Ansiedad y actividad general</i>	148
2.1.2.1. <i>Campo abierto</i>	148
2.1.2.2. <i>Laberinto elevado en cruz</i>	149
2.1.3. <i>Actividad exploratoria y atención: Tabla de agujeros</i>	151
2.1.4. <i>Habilidades sensorimotoras</i>	152
2.1.4.1. <i>Batería de pruebas sensorimotoras</i>	152
2.1.4.2. <i>Actividad espontánea: Actimetría</i>	153
2.1.4.3. <i>Coordinación motora: Rotarod</i>	154
DISCUSIÓN	159
1. Efectos del tratamiento crónico con melatonina durante la edad adulta y durante las etapas pre- y post-natales sobre las alteraciones cognitivas, neuromorfológicas y electrofisiológicas y sobre la neurodegeneración del ratón Ts65Dn.....	160
1.1. Efectos sobre las alteraciones cognitivo-conductuales.....	161
1.1.1. <i>Cognición</i>	161
1.1.2. <i>Hiperactividad, ansiedad y atención</i>	165
1.1.3. <i>Habilidades sensorimotoras</i>	166
1.2. Mecanismos implicados en los efectos pro-cognitivos causados por la melatonina tras su administración a ratones adultos.....	167
1.2.1. <i>Efectos sobre la hipocelularidad y la neurogénesis hipocampal</i>	167
1.2.2. <i>Efectos sobre la plasticidad (LTP) y conectividad sináptica</i>	169
1.2.3. <i>Efectos sobre la neurodegeneración cerebral</i>	171
CONCLUSIONES	179
BIBLIOGRAFÍA	183

Abreviaturas

5-HT	Serotonina
Aβ	β -amiloide
ApoB	Apolipoproteina B
APP	Proteína precursora del β amiloide (<i>Amyloid Precursor Protein</i>)
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico (<i>cyclic Adenosine Monophosphate</i>)
ATP	Adenosin trifosfato (<i>Adenosine Triphosphate</i>)
BAC	Cromosoma artificial de bacteria (<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>)
BACE1	β -secretasa (<i>Beta-secretase 1</i>)
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>)
BFCNs	Neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (<i>Basal Forebrain Cholinergic Neurons</i>)
bp	Pares de bases (<i>base pair</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CaMKII	Quinasa II calcio/calmodulina-dependiente (<i>calcium calmodulin dependent protein kinase II</i>)
CaN	Calcineurina
CFC	Condicionamiento del miedo a un contexto (<i>Context Fear Conditioning</i>)
ChAT	Acetilcolina transferasa (<i>Choline Acetyltransferase</i>)
CI	Coeficiente Intelectual
CLR	Calretinina
DAB	3,3'Diaminobenzidina
DAPI	4',6-Diamino-2-fenilindol diclorhidrato (<i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride</i>)
DCX	Doblecortina
Dde I	Desulfovibrio desulfuricans enzime I
DG	Giro dentado (<i>Dentate Gyrus</i>)

Abreviaturas

DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DPX	Resina sintética (<i>Distrene 80, Platicizer, Xylene</i>)
DYRK1A	<i>Dual Specificity Tyrosine-(Y)-Phosphorylation Regulated Kinase 1A</i>
EA	Enfermedad de Alzheimer
EEG	Electroencefalograma
EGL	Capa granular externa del cerebelo (<i>External Granular Layer</i>)
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
fEPSPs	Potenciales postsinápticos excitatorios evocados (<i>field Excitatory Postsynaptic Potentials</i>)
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GAD	Glutamato descarboxilasa (<i>Glutamic Acid Decarboxylase</i>)
GCL	Capa granular (<i>Granular Cell Layer</i>)
Girk2	Rectificador interno de potasio tipo 2 (<i>G protein-activated Inwardly Rectifying K⁺ channel subunit 2</i>)
HFS	Estimulación de alta frecuencia (<i>High-Frequency Stimulation</i>)
HIOMT	Hidroindol-O-metiltransferasa
HSA	Autosoma humano (<i>Homo Sapiens Autosome</i>)
IL-1β	Interleuquina-1 β
IL-6	Interleuquina-6
ipRGCs	Células ganglionares intrínsecamente fotosensibles de la retina (<i>Intrinsically photosensitive Retinal Ganglion Cells</i>)
LFS	Estimulación de baja frecuencia (<i>Low-Frequency Stimulation</i>)
LTD	Depresión a largo plazo (<i>Long-Term Depression</i>)
LTP	Potenciación a largo plazo (<i>Long-Term Potentiation</i>)

miRNAs	microRNAs
ML	Capa molecular (<i>Molecular Layer</i>)
MR	Medidas repetidas
mRNA	RNA mensajero
MMU	Cromosoma murino (<i>Mus Musculus</i>)
MRS	Resonancia magnética (<i>Magnetic Resonance Spectroscopic</i>)
MWM	Laberinto acuático de Morris (<i>Morris Water Maze</i>)
Mx1	Proteína de resistencia a mixovirus 1
NA	Noradrenalina
NBM	Núcleo basal de Meynert
NDS	Suero de burro normal (<i>Normal Donkey Serum</i>)
NGF	Factor de crecimiento nervioso (<i>Nerve Growth Factor</i>)
NMDA	N-metil-D-aspartato
NSQ	Núcleo supraquiasmático
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PTZ	Pentilenotetrazol
PVDF	Polivinilidenodifluoruro
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
Rd	Degeneración de la retina (<i>Retinal degeneration</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
ROS	Especies de oxígeno reactivas (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SD	Síndrome de Down
SGZ	Zona subgranular (<i>Subgranular Zone</i>)
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>

Abreviaturas

SNC	Sistema Nervioso Central
SOD1	Superóxido Dismutasa 1
SVZ	Zona subventricular (<i>Subventricular Zone</i>)
TBS	Patrón de estimulación theta (<i>Theta Burst Stimulation</i>)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TrkA	Receptor tirosín kinasa A (<i>Tyrosin kinase receptor A</i>)
TrkB	Receptor tirosín kinasa B (<i>Tyrosin kinase receptor B</i>)
TS	Ratón Ts65Dn
VGLUT1	Transportador vesicular de glutamato 1 (<i>Vesicular Glutamate Transporter 1</i>)
VZ	Zona ventricular
wt	Cepa silvestre (<i>Wild Type</i>)

Introducción

1. El síndrome de Down

1.1. Origen de la trisomía 21

El síndrome de Down (SD) es la causa más común de discapacidad intelectual de origen genético y afecta a 1 de cada 850 - 1000 nacimientos (Shin et al., 2009). En la especie humana, este síndrome se manifiesta a través de un conjunto de rasgos fenotípicos comunes debido a que las células del recién nacido poseen en su núcleo un cromosoma 21 (*Homo Sapiens Autosome 21*, HSA21) extra, es decir, 47 cromosomas en lugar de 46 (figura 1).

El 95% de los casos de SD son el resultado de una trisomía completa o simple del HSA21 y se produce por un fenómeno de no-disyunción meiótica de este cromosoma en la línea germinal de uno de los dos progenitores, normalmente de la madre. Sin embargo, la no-disyunción también puede ocurrir en las primeras divisiones embrionarias dando lugar, en el 1.5 % de los casos de SD, a mosaicismo. En este caso, la trisomía no está presente en todas las células del individuo, sino sólo en aquellas cuya estirpe procede de la primera célula mutada.

Alrededor del 5% de los casos restantes de SD presentan trisomía parcial debido a translocaciones que pueden ser robertsonianas o recíprocas (Hook, 1981).

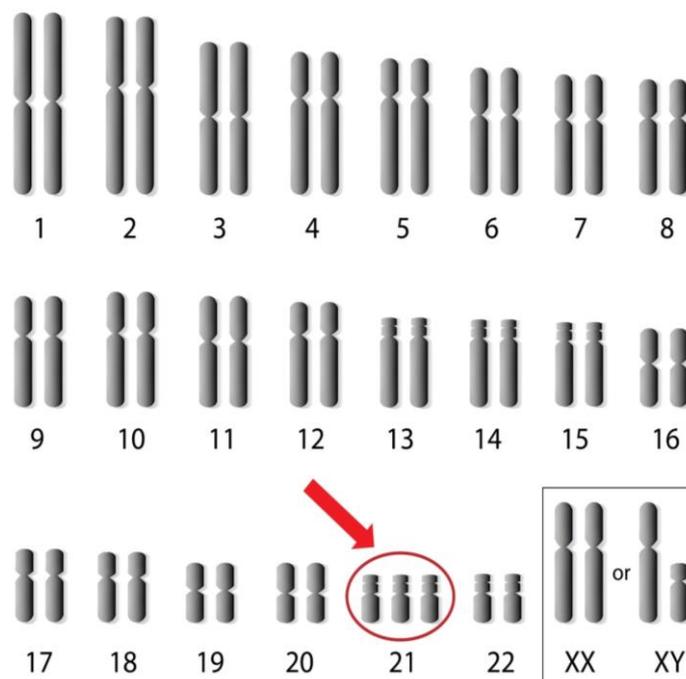


Figura 1. Representación del cariotipo de una persona con SD con el HSA21 triplicado. Tomada de <http://www.infirmus.es/sindrome-de-down/>

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

El HSA21 es el autosoma más pequeño del genoma y representa alrededor del 1.5% del contenido total de DNA en la célula. El HSA21 fue el segundo cromosoma humano en ser totalmente secuenciado y está compuesto por 33.5 millones de pares de bases de DNA en su brazo largo (21q) y 285 mil en su brazo corto (21p) (Hattori et al., 2000). Contiene aproximadamente 552 genes, de los cuales 161 codifican para proteínas y 5 para micro RNAs (miRNA). Todos ellos se encuentran altamente conservados en ratones. Otros 170 genes codifican para proteínas, pero están menos conservados y 185 genes no se pueden clasificar con total seguridad como codificadores de proteínas o productores de RNA funcional y, además, tampoco parecen estar conservados en regiones genómicas ortólogas de ratón (Pritchard et al., 1999; 2007; Sturgeon y Gardiner, 2011). El HSA21 tiene muy pocos genes en comparación con otros cromosomas, lo que explica la mayor viabilidad y esperanza de vida de las personas nacidas con trisomía del cromosoma 21, en comparación con aquellas que presentan trisomías de otros cromosomas (Reeves, 2000).

Por otro lado, es importante considerar que los cambios provocados por la trisomía en los niveles de proteínas codificadas por el HSA21, que poseen funciones reguladoras, como son las de transcripción y corte/empalme de mRNA, pueden ejercer efectos muy relevantes mediante la promoción o inhibición de la transcripción de genes que pueden ser ajenos al HSA21 (Toiber et al., 2010; Vilardell et al., 2011).

1.3. Características fenotípicas del SD

Aunque la sobreexpresión de un gen determinado puede tener un papel prioritario en la aparición de un fenotipo concreto, los fenotipos en el SD no son consecuencia de la triple presencia de un único gen sensible a la dosis, sino de las interacciones en los patrones de expresión que hay entre los genes localizados en el HSA21 o en otros cromosomas, por la influencia de elementos genéticos no codificadores y por un conjunto de influencias epigenéticas (Dierssen et al., 2012).

Se han propuesto dos teorías que tratan de explicar los efectos causados por la presencia de un cromosoma 21 extra en los distintos fenotipos del SD: la hipótesis de la “*dosis génica*” establece que las irregularidades que se producen en el SD son debidas a un efecto acumulativo de los productos procedentes de la sobreexpresión de genes individuales del HSA21 (Gardiner et al., 2004). Esta teoría propone que al sobrepasar un nivel umbral el fenotipo se manifiesta (Antonarakis, 2004; Antonarakis y Epstein, 2006). Por otro lado, la teoría de la

“inestabilidad del desarrollo amplificada” (Shapiro et al., 2001) defiende que la causa más importante del conjunto de rasgos fenotípicos se debe al aumento de la actividad de grupos de genes que provoca una disminución de la estabilidad u homeostasis genética. Por eso, cuantos más genes estén en trisomía, mayor susceptibilidad tendrá el feto para que surjan anomalías en su desarrollo (Korbel et al., 2009; Lyle et al., 2009; Yu et al., 2010a). No obstante, ambas hipótesis no se excluyen mutuamente. Los defensores de la segunda hipótesis admiten que algunos de los fenotipos del SD pueden deberse a la triple dosis de un gen particular del HSA21.

Recientemente, Letourneau et al. (2014) han estudiado fibroblastos de la piel de gemelos homocigotos, uno con SD y otro sin él. El estudio muestra diferencias de expresión en 182 genes entre los gemelos con un fondo genético idéntico. Parece ser que el cromosoma extra de uno de ellos perturba la actividad de la cromatina nuclear, lo que repercute en la actividad de regiones o dominios concretos del resto de cromosomas. Por consiguiente, se produce un exceso o defecto de productos génicos, que da lugar a un desequilibrio de la actividad celular en diversos órganos.

Por otro lado, también se han sugerido otros mecanismos adicionales para explicar la complejidad en las manifestaciones fenotípicas del SD. Entre ellos, alteraciones en el número de copias de elementos genómicos funcionales, como los miRNAs. De esta forma, la sobreexpresión en el HSA21 de miRNAs en el cerebro de personas con SD da lugar a una reducción en la expresión de proteínas diana específicas que van asociadas a la aparición de fenotipos concretos (Elton et al., 2010). Por otro lado, algunos fenotipos específicos del SD podrían deberse a la modificación de la arquitectura de la cromatina dentro del núcleo y a otros mecanismos epigenéticos como la metilación del DNA (Loudin et al., 2011).

1.4. Características generales del SD

La intensidad y frecuencia con la que se manifiestan los distintos fenotipos en el SD es muy amplia y difiere notablemente de un sujeto a otro por la compleja interacción que se da entre factores genéticos y medioambientales (Dierssen et al., 2012).

Las personas con SD presentan un conjunto característico de rasgos faciales y de aspecto corporal que son visibles desde el nacimiento. También presentan lentitud y reducción del crecimiento corporal, incluido el cefálico (microcefalia) (Kaminker et al., 2008).

Otra característica comúnmente encontrada en personas con SD es un retraso en el desarrollo motor, que ocasiona diversas alteraciones motoras presentes desde el nacimiento

Introducción

hasta la etapa adulta. Estas anomalías motoras son debidas tanto a una acusada hipotonía muscular como a alteraciones esqueléticas y en la morfología y función del cerebelo, una estructura que participa en el control y el aprendizaje motor (Kaminker et al., 2008).

Además, numerosas personas con SD presentan alteraciones en diferentes órganos y sistemas tales como cardiopatías, anomalías en el aparato digestivo y respiratorio (apneas), en el sistema inmune (leucemia) y endocrino, trastornos en la visión y audición y un incremento en la probabilidad de sufrir convulsiones (Shott et al. 2006a; 2006b; Kaminker et al., 2008). Por otro lado, existe una menor incidencia en el desarrollo de ciertos tumores sólidos con respecto a la población normal (Satgé et al., 2013).

1.5. Neurobiología del SD

Las personas con SD presentan numerosas alteraciones en la estructura y función del sistema nervioso central (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 revisaremos las bases funcionales, las características y las alteraciones del cerebro de las personas con SD que intervienen en la discapacidad intelectual de esta población.

1.5.1. Alteraciones morfológicas del SNC

➤ *Volumen encefálico reducido*

Las personas con SD presentan menor volumen y peso del cerebro desde las etapas prenatales (Guihard-Costa et al., 2006; Guidi et al., 2008; 2011). Sin embargo, las observaciones de cerebros *post-mortem* y diversos estudios de resonancia magnética (MRI, *Magnetic Resonance Imaging*) indican que en el SD 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 (Pinter et al., 2001a; Schmid et al., 1992; 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 existentes desde etapas tempranas del desarrollo son agravadas 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 Alzheimer (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 celular en el SD no está alterada durante las etapas tempranas de gestación (Golden et al., 1994; Weitzdoerfer et al., 2001; Guidi et al., 2008). Sin embargo, el número de neuronas se reduce durante las etapas tardías (a partir de la semana 19-23) en algunas áreas cerebrales. La densidad neuronal en el hipocampo, el giro hipocámpal, 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.

En el SD, uno de los mecanismos propuestos como responsables de esta hipocelularidad son las alteraciones que se producen en los procesos de neurogénesis desde etapas tempranas del neurodesarrollo. La proliferación celular está alterada en fetos y en niños con SD en el giro dentado (*Dentate Gyrus*, DG) y el ventrículo lateral 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;

Introducción

Chen et al., 2013). Sin embargo, estudios realizados *in vitro* en neuronas corticales de cerebros fetales con SD también demuestran defectos en la diferenciación neuronal lo que parece contribuir al menor número de neuronas encontradas en esta condición (Bahn et al., 2002; Esposito et al., 2008).

➤ *Apoptosis*

La apoptosis o muerte celular programada parece ser otro de los mecanismos responsables de la hipocelularidad que se observa en los cerebros SD. Los fetos SD muestran un aumento de la apoptosis en el hipocampo (Guidi et al., 2008). No obstante, los estudios de apoptosis en el SD han obtenido resultados contradictorios: por un lado, se han descrito aumentos en el número de células apoptóticas en cerebros y en fibroblastos cultivados *in vitro* de personas con SD (Anderson et al., 2000; Guidi et al., 2008; Dogliotti et al., 2010), así como cambios en proteínas reguladoras de los procesos apoptóticos en diferentes estructuras cerebrales (Sawa et al., 1997; Gulesserian et al., 2001; Engidawork et al., 2003; Helguera et al., 2005). Sin embargo, otros estudios no han encontrado diferencias o han mostrado una tasa reducida de muerte celular programada (Seidl et al., 1999; Contestabile et al., 2007).

➤ *Alteraciones en espinas, dendritas y en la conectividad sináptica*

La acusada hipocelularidad en distintas áreas del SNC de las personas con SD influye en la conectividad y plasticidad de sus circuitos sinápticos y, por tanto, en el procesamiento de la información.

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 un importante retraso en la aparición de espinas dendríticas y una alteración en su morfología (Marin-Padilla, 1976; Vuksic et al., 2002).

Durante la infancia, las neuronas de la corteza motora (Prinz et al., 1997), visual (Takashima et al., 1981; Becker et al., 1986) y parietal (Schulz y Scholz, 1992) muestran una hipotrofia dendrítica que continúa a lo largo de su vida y las espinas dendríticas son menos numerosas y más pequeñas (Suetsugu y Mehraein, 1980).

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 (Suetsugu 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). Además, en la

corteza frontal y temporal también se han encontrado disminuidos los niveles de debrina, una proteína localizada en las espinas dendríticas e implicada en la regulación de la morfología de las espinas y en la plasticidad sináptica (Shim y Lubec, 2002).

Los estudios con microscopía electrónica en cerebros con SD han mostrado 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 y da lugar al déficit cognitivo característico del SD (Williams et al., 2005; Wishart, 2007; Lott y Dierssen, 2010).

1.5.2. Alteraciones neuroquímicas

Las personas con SD también presentan alteraciones en los niveles de varios neurotransmisores y cambios en la expresión y función de sus receptores.

La degeneración del sistema colinérgico ocurre durante el envejecimiento del cerebro con SD (Schliebs y Arendt, 2011). En cerebros *post mortem* de pacientes adultos con SD se ha encontrado una menor actividad de la enzima acetilcolina transferasa (*Choline Acetyl Transferasa*, ChAT), encargada de la síntesis de acetilcolina (Godridge et al., 1987; Risser et al., 1997).

El sistema GABAérgico está también afectado en etapas fetales en el cerebro con SD. Por un lado, se ha demostrado que los niveles de ácido γ -aminobutírico (GABA) son bajos (Whittle et al., 2007) y, por otro, los experimentos realizados con neuroesferas han mostrado anomalías en sus receptores tales como una mayor expresión de la subunidad $\alpha 2$ y una menor expresión de la subunidad $\alpha 5$ y $\beta 3$ del receptor GABA_A (Bhattacharyya et al., 2009).

Aunque los estudios realizados con fetos 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).

Introducción

Otro neurotransmisor que se encuentra alterado en el SD es la serotonina (5-HT) que tiene un papel importante en la neurogénesis, diferenciación neuronal, desarrollo dendrítico, mielinización y sinaptogénesis (Whitaker-Azmitia, 2001). Estudios realizados en cerebros de fetos (Whittle et al., 2007) y adultos (Yates et al., 1986; Godridge et al., 1987; Risser et al., 1997) con SD han mostrado déficits de 5-HT en la corteza frontal así como una reducción del número de receptores de serotonina 5-HT_{1A} (Bar-Peled et al., 1991).

Los niveles de noradrenalina (NA) son normales en cerebros de fetos con SD (Whittle et al., 2007), pero durante la edad adulta disminuyen (Godridge et al., 1987; Risser et al., 1997), probablemente como consecuencia de la neurodegeneración del *locus coeruleus* (Mann et al., 1985; Coyle et al., 1986). Los receptores adrenérgicos están involucrados en vías de señalización que participan en procesos de aprendizaje y memoria. Los cerebros adultos con SD presentan daños funcionales en estos receptores y en la ruta de señalización de la adenilatociclasa y la fosfolipasa C- β (Lumbreras et al., 2006), similares en parte, a los que se observan en la enfermedad de Alzheimer (EA).

Las neurotrofinas tienen un papel crucial en la supervivencia neuronal, diferenciación, migración y plasticidad sináptica (Sofroniew et al., 2001; Campenot y McInnis, 2004; Chao et al., 2006). Por tanto, las alteraciones en su expresión podrían afectar a muchos aspectos del neurodesarrollo. Los estudios realizados en fetos con SD han puesto de manifiesto una expresión reducida del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el hipocampo (Guedj et al., 2009) y del BDNF y del receptor tirosín kinasa B (*Tyrosin kinase receptor B*, TrkB) en la corteza cerebral (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).

1.5.3. Alteraciones electrofisiológicas

Los estudios neuronales electrofisiológicos en humanos son muy escasos y están restringidos principalmente a neuronas del sistema nervioso periférico. Se han descrito alteraciones neurofisiológicas en la transmisión sináptica de neuronas cultivadas de ganglios raquídeos, obtenidas de fetos con SD (Nieminen et al., 1988). No obstante, los estudios realizados a nivel del SNC han detectado algunas anomalías electroencefalográficas (EEG) en los individuos adultos con SD que han desarrollado demencia (Devinsky et al., 1990). También se

han descrito diferencias en la coherencia EEG (Schmid et al., 1992) y alteraciones en los potenciales evocados relacionados con eventos en personas con SD (Karrer et al., 1998).

1.5.4. Alteraciones en los sistemas cognitivos

La discapacidad intelectual es el rasgo más sobresaliente del SD. Este término hace referencia a las limitaciones que presentan, no sólo en el funcionamiento intelectual, sino también en la conducta adaptativa que manifiestan en las habilidades sociales y cotidianas.

El coeficiente intelectual (CI) de una persona con SD varía entre 30 y 80 y en la actualidad, la media se encuentra en torno a 50. A partir de la adolescencia, el CI comienza a declinar. Asimismo, la velocidad de aprendizaje en su conjunto es menor que en el resto de la población (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 por 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 aportada de forma rápida y agrupada (Flórez, 1999; Maltese et al., 2014). Todo ello es el resultado de las anomalías estructurales y funcionales presentes en el SNC que han sido descritas anteriormente.

➤ *Aprendizaje y memoria en las personas con SD*

Son muchos los procesos implicados en los déficits de aprendizaje y memoria que presentan las personas con SD. A continuación se describirán los principales procesos afectados.

Memoria a corto plazo

Se sabe que la memoria a corto plazo de personas con SD es muy limitada; cuando se les pide recordar una lista de dígitos muestran claros déficits de retención (Lanfranchi et al., 2012). Este tipo de memoria está especialmente dañada cuando se trata de manejar información auditiva (Nash y Heath, 2011). Sin embargo, la memoria visuoespacial está relativamente conservada en el SD (Visu-Petra et al., 2007; Lanfranchi et al., 2012). En tareas de reconocimiento, cuando aumenta la carga de memoria o cuando se combinan las demandas visual y espacial, la ejecución de los niños con SD se ve alterada (Lanfranchi et al., 2004; 2012; Visu-Petra et al., 2007). 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

Introducción

temporal superior e inferior), las zonas parietales posteriores y el hipocampo (Lott y Dierssen, 2010).

Una modalidad de la memoria a corto plazo 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, similar al deterioro en el funcionamiento de la memoria de trabajo que presentan las personas con EA. Asimismo, las personas con SD también presentan mayores déficits en la memoria de trabajo verbal comparada con la visuoespacial que se encuentra mejor conservada (Chapman et al., 2000; Laws et al., 2003; Lanfranchi et al., 2012).

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 tienen un papel 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 partir de los 2 o 3 años las diferencias en el lenguaje se van haciendo más notables entre los niños normales y con SD (Laws et al., 2014). En estos últimos la habilidad tanto para adquirir nuevas palabras, como para vocalizar se desarrolla de forma más lenta (Laws et al., 2014). 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).

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 y Young, 2001). Por otro lado, la hipoplasia cerebelar también puede influir en las dificultades articulatorias del habla (Pinter et al., 2001b).

También se ha planteado la divergencia entre léxico y conocimiento sintáctico con un mayor deterioro del último en las personas con SD (Zampini et al., 2011; Galeote et al., 2013). La adquisición de léxico es escasa (Zampini et al., 2011; Galeote et al., 2013), pero con una adecuada estimulación pueden llegar a alcanzar una riqueza de vocabulario considerable (Numminen et al., 2001).

Además, 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). Así, el aprendizaje de nuevo vocabulario y la capacidad de lectura se ven en gran parte afectados por los déficits en el funcionamiento de estos sistemas de memoria (Nash y Heath, 2011; Purser y Jarrold, 2014).

1.6. La neurodegeneración en el SD

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). Aunque las bases biológicas de estos procesos aún no se conocen con exactitud, se sabe que tanto factores genéticos, debidos a la copia extra del HSA21, como epigenéticos están involucrados en el proceso de envejecimiento (Zigman, 2013).

1.6.1. Aumento del estrés oxidativo cerebral y envejecimiento precoz

Uno de los factores principales responsable del envejecimiento prematuro en la población SD es el exceso de estrés oxidativo que afecta en mayor medida a ciertas estructuras cerebrales como el hipocampo y la corteza (Furuta et al., 1995; Cenini et al., 2012). El incremento de estrés oxidativo en el SD se produce por la sobreexpresión de ciertos genes del HSA21 como *SOD1*, que codifica para la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1). Su función es la de canalizar ciertos radicales de oxígeno hacia la formación de peróxido de hidrógeno que, posteriormente, se descompone en agua por la acción de la glutatión peroxidasa y la catalasa. Como consecuencia de la sobreexpresión de la enzima SOD1, se produce un exceso de peróxido de hidrógeno que no puede ser compensado por la acción de las otras enzimas (Brugge et al., 1999) dando lugar a la generación de radicales libres que dañan las membranas celulares y deterioran lípidos, proteínas y el DNA de las células, llevándolas hacia el envejecimiento y la muerte (Perluigi y Butterfield, 2012; Di Domenico et al., 2013).

Por otro lado, las mitocondrias son la principal fuente de producción de superóxidos. En cultivos de neuronas y fibroblastos procedentes de pacientes con SD también se han descrito alteraciones en el funcionamiento mitocondrial y un aumento de la producción de superóxidos mitocondriales (Jovanovic et al., 1998; Kim et al., 2000). Estas anomalías parecen ser debidas a alteraciones del complejo I (Valenti et al. 2011) y de la metilación mitocondrial (Infantino et al., 2011).

El estrés oxidativo en el SD está presente desde los estadios fetales (Busciglio y Yankner, 1995; Busciglio et al., 2007; Lott, 2012) pudiendo alterar procesos como la neurogénesis, la diferenciación, la migración, el establecimiento de conexiones neuronales y la supervivencia neuronal (Pallardó et al., 2006; Busciglio et al., 2007; Perluigi et al., 2011).

Además, durante las etapas más tardías, el exceso de estrés oxidativo en el SD no sólo persiste sino que se agrava, acelerando los déficits cognitivos y la neurodegeneración (Busciglio

et al., 2007; Zigman y Lott, 2007; Perluigi y Butterfield, 2011; 2012; Di Domenico et al., 2013; Valenti et al., 2014).

1.6.2. Neuropatología de tipo Alzheimer

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los rasgos más constantes en el SD es la frecuente y temprana aparición de una neuropatología similar a la que ocurre en la EA que se manifiesta en el 100% de los casos a partir de los 40 años de edad (Teipel y Hampel, 2006; Carson et al., 2013; Mok et al., 2014).

De manera similar a lo que ocurre en la EA, en el SD se produce una atrofia en el hipocampo, en regiones neocorticales y en el cuerpo calloso que suele preceder a la aparición de la demencia (Fox et al., 2001; Beach et al., 2009). Además, también son frecuentes las alteraciones histopatológicas que van progresando con la edad, como la formación de placas amiloides debido a los depósitos de una sustancia de localización extraneuronal que se denomina proteína β -amiloide ($A\beta$) y de ovillos neurofibrilares que se deben a la acumulación intraneuronal de la proteína tau asociada a los microtúbulos y que se encuentra hiperfosforilada (*Microtubule Associated Phosphorylated Tau*, MAPT) (figura 2). Esta proteína se localiza a nivel neuronal en los axones y su función es estabilizar los microtúbulos. La MAPT, inicialmente soluble, va sufriendo procesos de hiperfosforilación que la hacen perder su flexibilidad y reducen su afinidad por enlazarse con los microtúbulos, lo que provoca una agregación de dichas proteínas que conduce a una desintegración del microtúbulo (Holtzman et al., 1996; Cataldo et al., 2008) y a la formación de los característicos ovillos neurofibrilares (Liu et al., 2008).

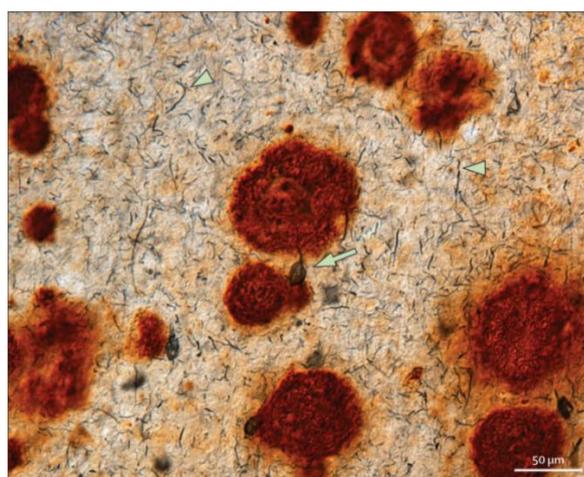


Figura 2. Neuropatología de la EA en el cerebro de un individuo con SD. Inmunohistoquímica del córtex frontal de una persona de 46 años con SD. Las placas amiloides se presentan en marrón con forma redondeada. La patología tau muestra ovillos neurofibrilares intracelulares (flecha) y neuritas distróficas (cabeza de flecha). Tomada de Lott y Dierssen (2010).

Introducción

La sobreexpresión de determinados genes presentes en el HSA21, junto con el exceso de estrés oxidativo y los procesos neuroinflamatorios, parecen ser factores determinantes para que las personas con SD comiencen a desarrollar este tipo de demencia (Niewenhuis-Mark, 2009, Flórez, 2010).

Uno de los genes implicados en la patología tipo EA encontrada en el SD es el *APP*, que codifica para la proteína precursora del β -amiloide (*Amyloid Precursor Protein*, APP). La hipótesis más aceptada para explicar el inicio y progreso de las lesiones cerebrales y muerte neuronal es la cascada del amiloide que explica la formación de las placas neuríticas por la acumulación de los péptidos β -amiloideos que dan lugar a un procesamiento incorrecto de la proteína APP por la acción de las enzimas β -secretasa (*β -site Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme 1*, BACE1) y γ -secretasa (figura 3). Este procesamiento da lugar a la formación de los dos péptidos neurotóxicos: el A β 40 y el A β 42 (Asuni et al., 2014; Tang et al., 2014). La sobreexpresión del gen *BACE2*, también situado en el HSA21 y que codifica para la enzima que ancla la proteína APP a la β -secretasa, también participa en la formación del β -amiloide (Myllykangas et al., 2005; Lockstone et al., 2007). Además, estos péptidos contribuyen a la formación de radicales libres lo que aumenta todavía más el estrés oxidativo cerebral y, por tanto, la neurodegeneración (Zigman y Lott, 2007).

Otros oligopéptidos más pequeños amiloidogénicos como A β 17-40/42 y A β 11-40/42, derivados también del procesamiento de la proteína APP, aumentan la neurotoxicidad mediante la formación de canales iónicos en la membrana que incrementan la entrada de calcio a la neurona (Jang et al., 2010).

Además del *APP*, otros genes del HSA21, incluidos *SOD1*, *ETS-2*, *DYRK1A* y *S100B*, también tienen un papel en la patología tipo Alzheimer que aparece en el SD (Head y Lott, 2004). En concreto, existe una estrecha relación entre la disfunción mitocondrial, la generación de especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) y la producción de péptido β -amiloide en el SD. El estrés oxidativo inducido por la sobreexpresión de *SOD1* y por la disfunción mitocondrial, contribuye a que el exceso de proteína APP dé lugar a la formación de agregados proteicos insolubles que constituyen las placas seniles.

El gen *DYRK1A*, también sobreexpresado en el SD, codifica para la quinasa DYRK1A, que fosforila sustratos en residuos específicos de serina y tirosina. El péptido A β 42 promueve el aumento de la transcripción del gen *DYRK1A* (Ji et al., 2010). A su vez, la sobreexpresión de DYRK1A contribuye a la temprana degeneración neurofibrilar, en parte, a través de la

hiperfosforilación de tau (Kimura et al., 2007; Wegiel et al., 2008). DYRK1A también parece estimular la fosforilación de la proteína APP, elevando los niveles de los péptidos A β 40 y A β 42 (Wegiel et al., 2011).

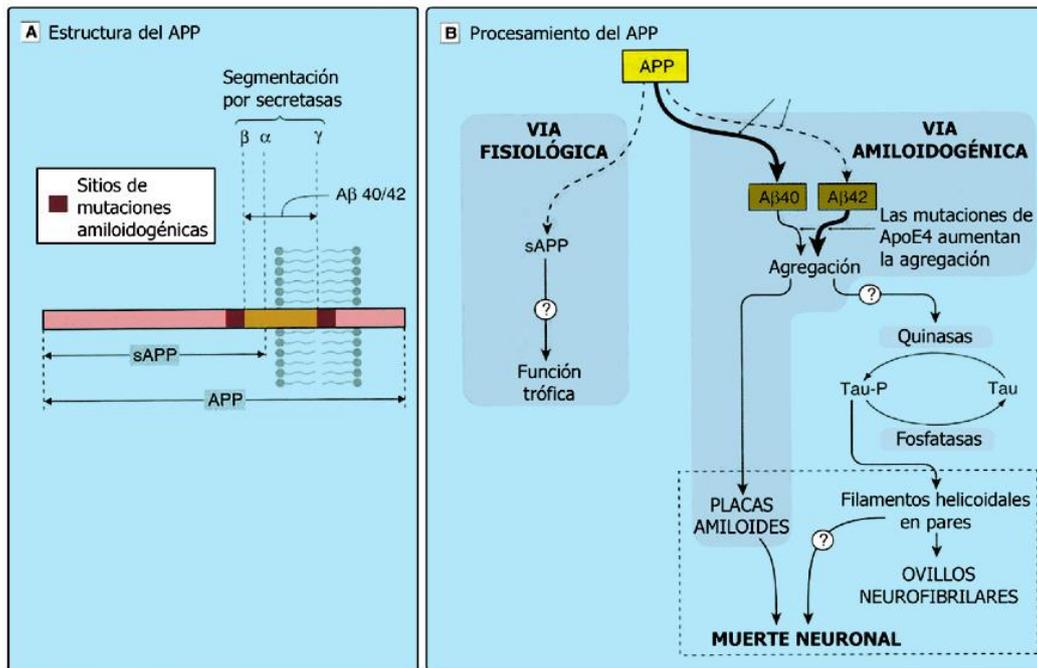


Figura 3. Cascada de la producción de β -amiloide a partir de la proteína precursora APP. En (A) se muestran los sitios de segmentación de APP por parte de las secretasas. En (B) se muestra la vía de procesamiento patológico por acción de las β - y γ -secretasas, para originar los péptidos amiloides A β 42 y A β 40. Tomada de Rang et al. (2004).

El hecho de que aparezcan estas lesiones neuropatológicas en el cerebro de las personas con SD no significa que todos los casos se acompañen de demencia. Su aparición dependerá de la intensidad y localización de las lesiones, es decir, de que afecten a puntos críticos del cerebro (Powell et al., 2014). Las placas y ovillos se presentan principalmente en regiones cerebrales involucradas en el aprendizaje, la memoria y los comportamientos emocionales. Así, estructuras como la corteza frontal y el hipocampo desarrollan antes la progresión de neuropatología de tipo EA que otras como el cerebelo (Holland et al., 2000; Cataldo et al., 2004; Millan Sanchez et al., 2012). En el SD, el β -amiloide se deposita inicialmente en las capas superficiales de la corteza frontal y, posteriormente, se traslada a capas corticales más profundas (Azizeh et al., 2000), lo que explica que la temprana deficiencia prefrontal es la característica más específica de la demencia tipo Alzheimer en las personas con SD (Deb et al., 2007; Ball et al., 2008; Krinsky-McHale et al., 2008). A continuación, las placas comenzarían a depositarse en otras estructuras como el giro parahipocampal y temporal inferior, acumulándose en el área CA1, el subículo, capa molecular y otras áreas del hipocampo (Leverenz y Raskind, 1998).

1.6.3. La degeneración colinérgica en el SD

Tanto en el SD como en la EA se produce una degeneración asociada a la edad de los sistemas colinérgico y noradrenérgico (Coyle et al., 1986). Dado que las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal conforman las principales inervaciones colinérgicas del hipocampo y la corteza, su pérdida funcional parece estar implicada en el deterioro de la memoria explícita y la atención observado en el SD (Kishnani et al., 1999).

El sistema colinérgico del prosencéfalo basal es aparentemente normal en los fetos y bebés con SD, tanto en lo que se refiere al número de neuronas, como de actividad ChAT (Lubec et al., 2001), pero empieza a degenerar en la adolescencia tardía y en la edad adulta (Berger-Sweeney, 2003; Rovelet-Lecrux et al., 2006; Theuns et al., 2006; Whittle et al., 2007; Armstrong et al., 2013; Grothe et al., 2014). A partir de ese momento, en el cerebro de las personas con SD, se produce un descenso de los niveles de acetilcolina y de las enzimas relacionadas con su metabolismo (Schliebs y Arendt, 2011; Millán Sánchez et al., 2012).

Diversos estudios realizados en modelos animales, tanto de EA (Yan et al., 2004) como de SD (Salehi et al., 2006), señalan que el aumento de la expresión de APP contribuye a la disfunción colinérgica, causando anomalías en el transporte axonal del factor de crecimiento nervioso (*Nerve Growth Factor*, NGF), neurotrofina necesaria para mantener la estructura y función de estas neuronas. En humanos, los cultivos de fibroblastos de cerebros con SD presentan anomalías morfológicas y funcionales de la vía endocítica del NGF que se revierten tras disminuir la expresión del gen *APP* (Sendera et al., 2000; Jlang et al., 2010). Asimismo, Sendera et al. (2000) encontraron una importante reducción en el número de neuronas que expresaban el receptor tirosín kinasa A (*Tyrosin kinase receptor A*, TrkA) del NGF en el núcleo basal de Meynert (NBM) de personas con SD. Estos autores demostraron que la pérdida de la densidad de receptores trKA se correlaciona con la atrofia neuronal y con un deterioro cognitivo severo como el que aparece en la EA.

1.6.4. La neuroinflamación en el SD

En el cerebro con SD y con EA también se ha encontrado un aumento de los procesos neuroinflamatorios, como un incremento de la activación de las células de la microglía y la producción de citoquinas proinflamatorias, lo que contribuye aún más a la pérdida de determinadas poblaciones neuronales (Griffin et al., 1989; Wenk et al., 2000; Wilcock and Griffin, 2013). En la EA los astrocitos y la microglía se agrupan alrededor de las placas amiloides lo que sugiere que el β -amiloide es un desencadenante de esta cascada inflamatoria. Sin

embargo, la inflamación glial continúa incrementándose incluso cuando la carga amiloide permanece relativamente estable desde su inicio, es decir, una vez iniciado, el proceso se autoabastece (Wilcock y Griffin, 2013).

2. Modelos murinos de SD

Uno de los principales objetivos de la investigación del SD es identificar los genes del HSA21 que están implicados en la manifestación de los principales fenotipos de esta condición. Esta estrategia ayudará a dilucidar los mecanismos celulares y moleculares responsables de los fenotipos más relevantes del SD, identificar posibles dianas terapéuticas y desarrollar tratamientos eficaces. Para ello, por un lado se han analizado diversos casos de personas con trisomías parciales del HSA21, sin embargo, el número de individuos con estas trisomías es escaso y existe gran variación de los fenotipos clínicos que manifiestan. Por otro lado, a través de técnicas de ingeniería genética, se han desarrollado una gran variedad de modelos murinos de SD que sobreexpresan uno o un grupo de genes homólogos a los del HSA21 (figura 4).

El análisis comparativo de los fenotipos observados entre los diferentes modelos ha permitido un mayor conocimiento de los genes que tienen un papel más relevante en los distintos fenotipos encontrados en el SD. En las siguientes secciones se describen las características más importantes de algunos de los modelos murinos usados en el estudio del SD (ver Rueda et al., 2012).

2.1. Modelos trisómicos para genes del MMU16, MMU17 y MMU10

De los 552 genes que contiene el HSA21, 166 son ortólogos a los genes localizados en regiones sinténicas de los cromosomas 16, 17 y 10 de ratón: MMU16 (110 genes), MMU17 (19 genes) y MMU10 (37 genes) (Sturgeon and Gardiner, 2011). Así, se han desarrollado diversos modelos murinos portadores de una copia extra total o parcial del MMU16, MMU17 y MMU10 (figura 4).

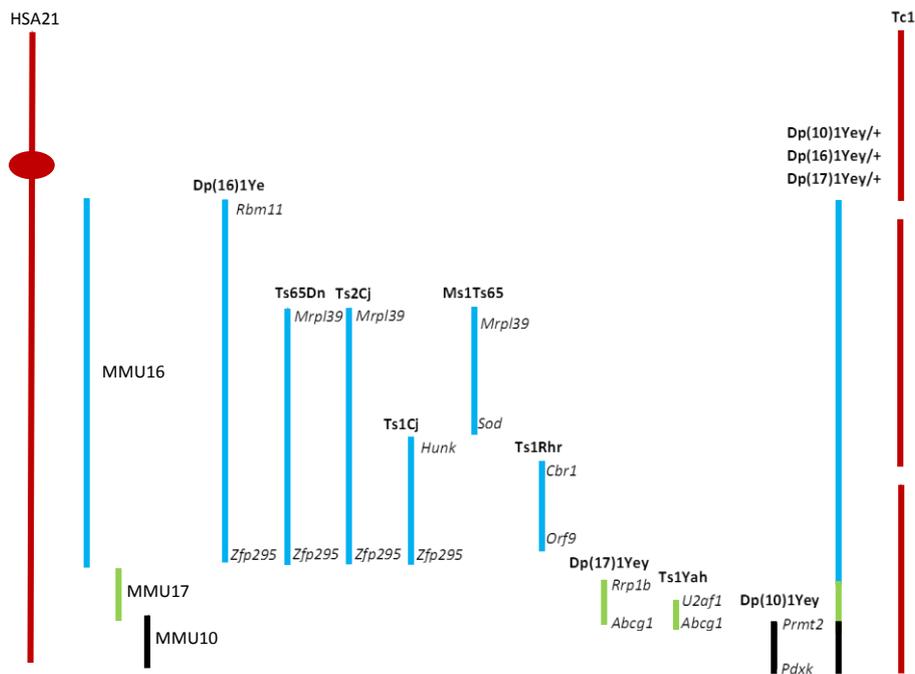


Figura 4. Representación esquemática del HSA21, de las regiones sinténicas murinas del MMU16 (azul), MMU17 (verde) y MMU10 (negro) y de los diferentes modelos murinos de SD trisómicos para diferentes grupos de genes ortólogos a los del HSA21. Los genes que delimitan los fragmentos triplicados en cada modelo se presentan en cursiva. Modificado de Rueda et al. (2012).

➤ **Ts16**

El ratón Ts16, el primer modelo de ratón de SD, se generó mediante una translocación robertsoniana espontánea (Gropp, et al., 1975). Este modelo presenta triplicado todo el MMU16. Sin embargo, también presenta sintenias con regiones de los cromosomas HSA3, HSA8, HSA16 y HSA21 y, por lo tanto, tiene triplicados muchos genes que no están en trisomía en el SD. Además, debido a que los embriones del Ts16 mueren en el útero, no es posible estudiar los fenotipos en estadíos post-natales. A pesar de ello, este modelo ha permitido el estudio de importantes alteraciones inherentes al desarrollo en el SNC o las malformaciones cardiacas encontradas en muchos casos de SD (Waller, et al., 2000; Bambrick y Fiskum, 2008; Acuña et al., 2012).

➤ **Ts65Dn**

El ratón Ts65Dn (TS) fue generado irradiando los testículos de ratones macho hasta conseguir una translocación no robertsoniana recíproca (Davisson, et al., 1990) en la región centromérica del cromosoma 17 que contiene triplicada una porción del cromosoma 16 similar a un fragmento del HSA21 (figura 5). El segmento trisómico del ratón TS se extiende desde el

gen *Mrpl139* al *Znf295* y contiene aproximadamente 92 genes ortólogos a los genes del HSA21 (Sturgeon y Gardiner, 2011). Además, también porta una trisomía de ~10 Mb del MMU17 que contiene 60 genes no homólogos a los genes del HSA21 (Duchon et al., 2011). Por tanto, muchos de los genes encontrados en el HSA21 no están triplicados en este ratón y otros genes no triplicados en el SD se encuentran en trisomía en este modelo. Sin embargo, al comparar los fenotipos del ratón TS con los de otros modelos de trisomía parcial se observa que los genes triplicados en este modelo contribuyen a la aparición de diversos fenotipos del SD incluyendo las deficiencias cognitivas y neuroanatómicas.

Los ratones TS transmiten el cromosoma extra, en segregación libre, a través de la línea germinal femenina ya que, al igual que los varones con SD, los machos TS son estériles. Otro inconveniente del ratón TS es la dificultad de su reproducción: no sólo las hembras producen pocas crías, sino que el porcentaje de crías con la trisomía heredada alcanza sólo un 30 - 40 %. Aunque muchos de ellos mueren durante el periodo perinatal (Roper et al., 2006a), estos ratones alcanzan la edad adulta, crecen, se desarrollan y envejecen, lo que permite hacer estudios en etapas post-natales y adultas.

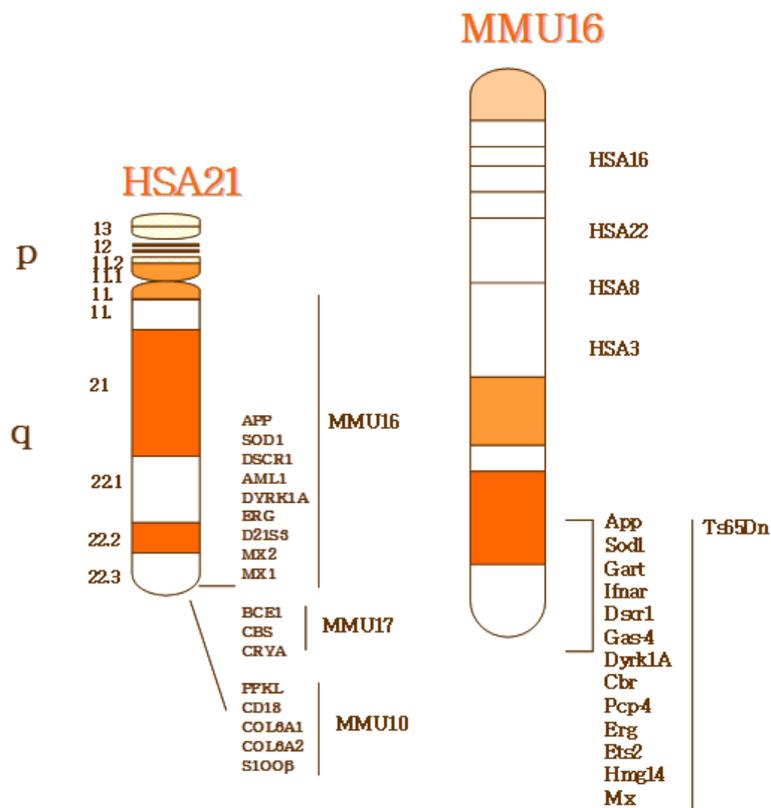


Figura 5. Representación esquemática del cromosoma 21 humano (HSA21) y del cromosoma 16 de ratón (MMU16). Se indican las regiones sinténicas entre estos dos cromosomas así como con otros cromosomas. También se señala la región que está triplicada en el ratón trisómico Ts65Dn.

➤ **Ts2Cje**

El ratón Ts2Cje tiene triplicado el mismo segmento cromosómico que el ratón TS pero translocado en el cromosoma 12 (Villar et al., 2005) lo que hace que el índice de fertilidad y reproducción sea mayor (Villar et al., 2005). Aunque este modelo no ha sido totalmente caracterizado, los ratones Ts2Cje presentan fenotipos similares a los encontrados en el TS como alteraciones en el volumen cerebral, en los procesos neurogénicos, en la densidad de espinas dendríticas, en la neurotransmisión y en la memoria dependiente del hipocampo (Villar et al., 2005; Belichenko et al., 2007; Aldridge et al., 2007; Ishihara et al., 2010; Kaur et al., 2014).

➤ **Ts1Cje**

Este modelo murino presenta triplicados 81 genes localizados en la región del MMU16 que se extiende desde *Sod1* hasta *Znf295*, aunque el gen *Sod1* extra que contiene no es funcional (Sago, et al., 1998). Además, los ratones Ts1Cje presentan una monosomía de 11 genes en la parte más telomérica del MMU12 (Duchon et al., 2011). Este modelo presenta diversos fenotipos alterados encontrados en el TS como las anomalías craneofaciales, incrementos en los niveles de estrés oxidativo (Shukkur et al., 2006), un volumen cerebral reducido durante el período embrionario (Aldridge et al., 2007; Ishihara et al., 2010), hipocelularidad cerebral (Ishihara et al., 2014) y alteraciones en la ejecución de pruebas de memoria dependientes del hipocampo (Belichenko et al., 2007). Todos estos fenotipos están menos alterados que en el ratón TS.

➤ **Ms1Ts65**

Este modelo tiene una trisomía parcial de 33 genes localizados en la región que se extiende desde *App* hasta *Sod1* (Sago, et al., 2000), que están triplicados en el ratón TS pero no en el Ts1Cje. Por tanto, este modelo permite determinar la contribución de la región sobreexpresada en el ratón TS, pero no en el Ts1Cje. El ratón Ms1Ts65 tiene menos alteraciones fenotípicas características del SD que los anteriores modelos trisómicos (Belichenko et al., 2007; Moldrich et al., 2007; Sago et al., 2000).

➤ **Ts1Rhr**

Olson et al. (2004) crearon el ratón Ts1Rhr el cual tiene triplicada la región comprendida entre *Cbr1-Orf9* que contiene 33 genes. Este ratón no presenta alteraciones craneofaciales ni los defectos cognitivos del modelo TS (Richtsmeier, et al., 2002; Olson et al., 2007).

➤ **Dp(16)1Yey**

Este modelo desarrollado por Li et al. (2007) tiene triplicada una región de 22.9 Mb del MMU16 que contiene todos los genes de este cromosoma ortólogos a los de HSA21. Estos animales sobreviven al nacimiento y llegan a alcanzar los 10 meses de edad. Además, presentan numerosas características fenotípicas similares a las encontradas en el SD y el ratón TS (Zhang et al., 2014; Starbuck et al., 2014).

➤ **Ts1Yah, Dp(17)1Yey/+**

El Ts1Yah y el Dp(17)1Yey/+ presentan triplicados 12 (Pereira et al., 2009) y 19 (Yu et al., 2010a; 2010b; Sturgeon y Gardiner, 2011) genes, respectivamente, de la región MMU17 sinténica a la región subtelomérica del HSA21. El Ts1Yah presenta alteraciones en algunas pruebas de memoria como la del reconocimiento de objetos y el Y-maze y también en pruebas que miden actividad y ansiedad como el campo abierto. Sin embargo, muestra una mejoría de la memoria espacial dependiente de hipocampo en el laberinto acuático de Morris, con un aumento en la intensidad y duración de la potenciación a largo plazo (*Long Term Potentiation*, LTP) hipocampal (Pereira et al., 2009). Por otro lado, el ratón Dp(17)1Yey/+ no muestra alteraciones en pruebas de memoria dependientes del hipocampo (Yu et al., 2010b) pero sí presenta un incremento de la LTP (Yu et al., 2010b).

➤ **Dp(10)1Yey/+**

Este ratón tiene triplicados 37 genes de la región del MMU10 sinténica a la parte distal del HSA21 (Yu et al., 2010a; Sturgeon y Gardiner, 2011). La triple dosis de los genes contenidos en esta región no causa alteraciones cognitivas, conductuales o en la LTP hipocampal (Yu et al., 2010a, 2010b).

➤ **Dp(10)1Yey/+Dp(16)1Yey/+Dp(17)1Yey/+**

Este modelo, contiene triplicadas todas las regiones sinténicas del HSA21 en el MMU10, MMU16 y MMU17 y muestra numerosos fenotipos que se encuentran alterados en el SD (Yu et al. 2010a). A diferencia del modelo TS, los machos Dp(10)1Yey/+Dp(16)1Yey/+Dp(17)1Yey/+ son fértiles (Yu et al., 2010a). A nivel cognitivo-conductual, este ratón manifiesta déficits en pruebas de memoria dependientes del hipocampo (Yu et al., 2010b) así como alteraciones en la LTP hipocampal (Yu et al., 2010b). Igual que ocurre en el ratón TS, no se han detectado placas β -amiloides u ovillos neurofibrilares en el cerebro de este ratón, aunque los niveles transcripcionales de App estaban aumentados en un 50 % (Yu et al., 2010b).

2.2. Modelos transcromosómicos (HSA21)

➤ Tc1

Este modelo presenta una trisomía casi total del HSA21 (O'Doherty et al., 2005) y muestra numerosos fenotipos relevantes encontrados en el SD (Reynolds, 2010; Duchon et al., 2010; Haas et al., 2013). Aunque el ratón Tc1 es considerado el modelo más completo de SD, también muestra varias limitaciones. Uno de los problemas es que presenta niveles variables de mosaicismo del HSA21 en diferentes tejidos, lo que dificulta el análisis de las consecuencias fenotípicas (Reeves et al., 2006). Además, este modelo tiene una delección de aproximadamente 19 genes, por lo tanto, sólo tiene triplicados el 83 % de los genes del HSA21.

2.3. Modelos transgénicos

Aunque los modelos trisómicos descritos anteriormente presentan muchos fenotipos característicos del SD, no permiten el estudio de los efectos de la sobreexpresión de genes específicos en estos fenotipos. Por ello se han creado distintos modelos murinos transgénicos y de pérdida de función de genes únicos que no pretenden reproducir todos los fenotipos del SD sino encontrar la relación de un gen particular con alguno de los fenotipos propios del síndrome y facilitar la identificación de posibles dianas terapéuticas moleculares.

Uno de los genes candidatos sensible a la dosis que ha recibido más interés por su posible implicación en numerosos fenotipos del SD es el gen *DYRK1A* (Dierssen y Lagran, 2006). Los ratones transgénicos que sobreexpresan Dyrk1A muestran dificultades de aprendizaje e importantes déficits de memoria espacial (Altafaj et al., 2001; 2013; Ahn et al., 2006) así como una alteración de la LTP y LTD (Kleschevnikov et al., 2004), lo que sugiere un papel importante de este gen en estos fenotipos. Además de este modelo, se han desarrollado numerosos animales transgénicos o con pérdida de función para diferentes genes que están triplicados en el SD (Dierssen et al., 2009; Fillat et al., 2010; Gotti et al., 2011).

3. El ratón Ts65Dn como modelo de SD

El ratón Ts65Dn (TS) es el modelo más aceptado y mejor caracterizado para el estudio del SD, por ello, ha sido el modelo elegido para la realización de los estudios que se presentan en esta tesis doctoral. 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).

3.1. 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 (Bianchi et al., 2010a; 2010b; Baxter et al., 2000; Lorenzi et al., 2006).

Esta reducción de volumen en distintas áreas encefálicas está relacionada con una reducción en la 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, el número de células granulares y de Purkinje es menor desde estadios post-natales tempranos hasta la edad adulta (Baxter et al., 2000; Roper et al., 2006a; Contestabile et al., 2006; García-Cerro et al., 2014).

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 neurodegeneración.

Tabla 1. Características fenotípicas comunes entre personas con SD y el ratón TS. Modificado de Rueda et al. (2012).

Alteraciones	SD	Ts65Dn
<i>Volumen cerebral</i>	Reducido	Reducido
<i>Densidad neuronal</i>	Reducida	Reducida
<i>Volumen cerebelar</i>	Reducido	Reducido

Introducción

Densidad neuronal cerebelar	Reducida	Reducida
Neurogénesis	<ul style="list-style-type: none"> Alteraciones en la proliferación de los precursores neurales Retraso del ciclo celular Alteraciones en la neurodiferenciación Alteraciones en la neurogénesis cerebelar 	<ul style="list-style-type: none"> Alteraciones en la proliferación de los precursores neurales Retraso del ciclo celular Alteraciones en la neurodiferenciación Alteraciones en la neurogénesis cerebelar
Neurodegeneración	<ul style="list-style-type: none"> Neuropatología de tipo EA Presencia de placas de β-amiloide y ovillos neurofibrilares Pérdida de neuronas colinérgicas Aumento del estrés oxidativo Microglía sobreactivada Aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias 	<ul style="list-style-type: none"> Aumento en los niveles de APP y péptidos β-amiloides Degeneración de las neuronas colinérgicas Aumento del estrés oxidativo Microglía sobreactivada
Dendritas y espinas dendríticas	<ul style="list-style-type: none"> Alteraciones en la morfología Densidad reducida 	<ul style="list-style-type: none"> Alteraciones en la morfología Densidad reducida
Densidad sináptica		Reducida
Balance excitación/inhibición	<ul style="list-style-type: none"> Niveles reducidos de GABA en fetos Niveles reducidos de glutamato y aspartato en adultos 	<ul style="list-style-type: none"> Aumento del número de sinapsis inhibitorias Disminución del número de sinapsis excitatorias Redistribución de las sinapsis inhibitorias Aumento del número de interneuronas GABAérgicas Alteraciones en la estructura del receptor GABA_A
Electrofisiología	<ul style="list-style-type: none"> Alteraciones EEG Alteraciones en los potenciales evocados 	Alteraciones en la LTP hipocampal
Cognitivo-Conductuales	<ul style="list-style-type: none"> Retraso en el desarrollo Hiperactividad ocasional Atención reducida Alteración del aprendizaje Alteración de la memoria Adquisición tardía de habilidades motoras Habilidades lingüísticas alteradas 	<ul style="list-style-type: none"> Retraso en el desarrollo Hiperactividad Atención reducida Alteración del aprendizaje Alteración de la memoria Adquisición tardía de habilidades motoras
Otras	<ul style="list-style-type: none"> Infertilidad varones Menor respuesta al dolor Alteraciones craneofaciales 	<ul style="list-style-type: none"> Infertilidad machos Menor respuesta al dolor Alteraciones craneofaciales

3.2. 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 estadios 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; Contestabile et al., 2007; Bianchi et al., 2010; Clark et al., 2006; 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 mucho 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 estadios 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 el cerebelo, tan sólo un pequeño porcentaje de células adquieren un fenotipo neuronal (Contestabile et al., 2009a).

Apoptosis

Al igual que en el SD, los estudios de apoptosis en el ratón TS, han mostrado resultados contradictorios. Algunos grupos han descrito un aumento en el número de células apoptóticas en el cerebro de fetos del ratón TS (Contestabile et al., 2007). Sin embargo, anteriores estudios de este laboratorio demuestran que, aunque a los 12 meses de edad los niveles de expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-X(L) son menores en el hipocampo, no existen cambios en otras proteínas pro- o anti-apoptóticas involucradas en la vía mitocondrial o en la extrínseca de la apoptosis en la corteza o en el hipocampo de estos animales (Rueda et al., 2011). Además, tampoco se han encontrado cambios en los marcadores moleculares o celulares de la apoptosis (Rueda et al., 2011), lo que sugiere que la muerte celular programada no juega un papel importante en la hipocelularidad encontrada en el cerebro de este ratón.

3.3. 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).

3.4. 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). Además, los ratones TS presentan mayor número de neuronas GABAérgicas o 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 $\beta 2$ y $\beta 3$ del receptor GABA_A en el hipocampo (Belichenko et al., 2009b) y de la subunidad $\alpha 1$ de este receptor en sinaptosomas de cerebro del ratón TS está reducida (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 excitatoria, en la que está involucrada la señalización mediada por el receptor NMDA. Este receptor, junto con los AMPA, es esencial para la codificación de la memoria. En los ratones TS, se ha descrito 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 coeruleus* a partir de los 6 meses de edad (Salehi et al., 2009). Además, aunque 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 (Granholtm et al., 2000; Cooper et al., 2001; Hunter et al., 2003; 2004). 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 (Bartus et al., 2000; Baxter et al., 1999) (ver apartado 1.6. "La neurodegeneración en el SD").

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).

3.5. Alteraciones en la plasticidad sináptica y en la LTP

En el ratón TS se han observado anomalías en la plasticidad sináptica a nivel hipocampal. La LTP es el fenómeno fisiológico que subyace a la plasticidad sináptica y se cree que es responsable de la formación de nuevos aprendizajes y memorias (Cramer y Galdzicki, 2012). La información llega al hipocampo y viaja a través del circuito trisináptico hasta integrarse en el cerebro de forma permanente. La primera sinapsis de la vía trisináptica se produce en la vía temporodentada dando lugar a la excitación de las neuronas granulares que dirigen sus axones (fibras musgosas) hacia las dendritas apicales de las células piramidales de CA3 en el *stratum lucidum* (segunda sinapsis de la vía trisináptica). A continuación, las fibras musgosas excitan a las neuronas piramidales de CA1 (tercera sinapsis). Cuando se induce la LTP mediante la administración de un TBS (*Theta Burst Stimulation*, TBS), la estimulación sincrónica de alta frecuencia (*High-Frequency Stimulation*, HFS) de neuronas específicas del hipocampo, da lugar un incremento de la eficacia de las sinapsis y por tanto a una intensificación duradera en la transmisión de señales. Sin embargo, la estimulación de baja frecuencia (*Low-Frequency Stimulation*, LFS) produce una disminución de la activación de las sinapsis del circuito trisináptico, es decir, induce la depresión a largo plazo (*Long-Term Depression*, LTD), lo que supone una reducción de la eficacia de la sinapsis neuronal (figura 6).

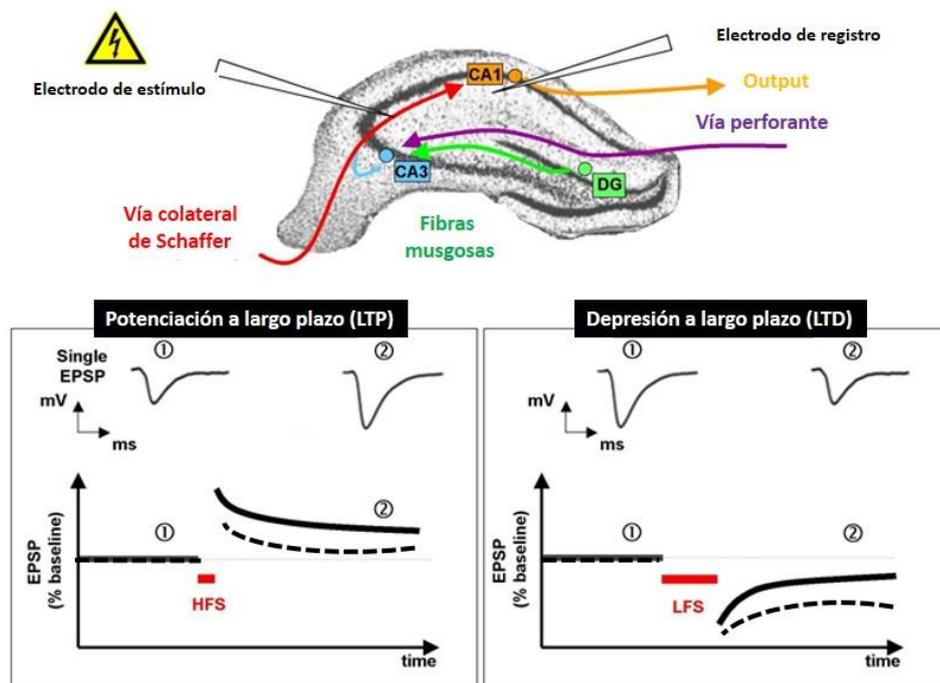


Figura 6. Representación esquemática de la vía trisináptica del hipocampo (imagen superior) y de la inducción y el registro de la LTP y LTD en el hipocampo de un ratón control (imagen inferior). Las líneas discontinuas representan el registro de un ratón TS que muestra una LTP disminuida y una LTD aumentada. Modificada de Riedemann et al. (2010).

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 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). 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 3.4. “Desequilibrio en el balance excitación-inhibición cerebral: el papel del GABA y el glutamato”). Además, la disminución de la 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).

3.6. 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.

Introducción

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 elevados los niveles 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, el cerebro de los ratones TS también presenta hiperfosforilación de tau (Liu et al., 2008). En el ratón TS, la sobreexpresión de APP también parece estar implicada en la degeneración de neuronas colinérgicas y noradrenérgicas que aparece en este modelo 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*, por lo que su sobreexpresión tiene como consecuencia la sobreproducción de radicales libres altamente reactivos y tóxicos. En este modelo se han detectado niveles elevados de ROS tanto en la corteza como en el hipocampo (Lockrow et al. 2009). Además, estudios realizados *in vitro* con neuronas procedentes del ratón TS han mostrado defectos en el complejo I mitocondrial que contribuyen a la acumulación de ROS (Bambrick et al., 2003).

El cerebro del ratón TS también muestra cambios neuroinflamatorios como la activación de la microglía tanto en el hipocampo como en el prosencéfalo basal (Lockrow et al., 2011; Hunter et al., 2004), que juega un papel importante en la pérdida de neuronas colinérgicas (Kim y Suh, 2009). Además, Roberson et al. (2012) describieron alteraciones de los niveles de algunas citoquinas (IL-1 β , GM-CSF, MIP-1 α) en el hipocampo de estos ratones.

3.7. Alteraciones cognitivas y conductuales

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

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 deterioro en la estabilidad y en la coordinación motora (Costa et al., 1999).

El ratón TS es hiperactivo durante la oscuridad (Reeves et al., 1995; Escorihuela 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, estructura implicada en la memoria espacial, como se ha observado en las pruebas del laberinto radial (Demas et al., 1996; Bianchi et al., 2010b) o en el laberinto acuático de Morris (*Morris Water Maze*, MWM) (Reeves et al., 1995; Escorihuela et al., 1998; Sago et al., 2000; Martínez - Cué et al., 2002; Martínez - Cué et al., 2005).

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), el MWM (Escorihuela et al., 1998; Martínez-Cué et al., 2014) y el laberinto radial (*Radial Arm Maze*, 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 (*Novel Object Recognition*, NOR) (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 (Wenger et al., 2004; Dowdy - Sanders y Wenger, 2006; Whitney y Wenger, 2013).

Con la edad, al igual que ocurre en el SD, las alteraciones en memoria y aprendizaje del ratón TS se agravan (Hyde and Crnic., 2001; Hunter et al., 2003).

4. La melatonina

4.1. Síntesis, secreción, circulación y metabolismo de la melatonina

La melatonina es una hormona indólica, sintetizada y secretada principalmente por la glándula pineal (Stehle et al., 2011), que se encuentra presente en multitud de organismos a lo largo de toda la escala evolutiva (Tan et al., 2003). Esta hormona, se sintetiza a partir del

Introducción

aminoácido triptófano, que posteriormente se convierte en 5-HT a través de las enzimas triptófano hidrolasa y 5-hidroxitriptófano descarboxilasa (Wurman y Axelrod, 1968). A partir de este momento, la 5-HT se transforma en N-acetilserotonina por acción de la N-acetil transferasa (NAT), la enzima limitante en la síntesis de melatonina. Finalmente, la N-acetilserotonina es convertida en melatonina mediante O-metilación, por medio de la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) (Wurman y Axelrod, 1968) (figura 7).

Además de en los pinealocitos, la melatonina también se sintetiza en otros tejidos (Acuña-Castroviejo et al., 2014) y está presente en casi todos los fluidos biológicos, incluyendo el fluido cerebroespinal, saliva, bilis, líquido sinovial, líquido amniótico y leche materna (Acuña-Castroviejo et al., 2014). La mayor parte de melatonina circulante viaja por el plasma unida a la albúmina (70%) y una pequeña parte en forma libre (30%) (figura 7). Otra parte se libera hacia el líquido cefalorraquídeo, donde se encuentran niveles de melatonina muy superiores a los circulantes (Tan et al., 2003).

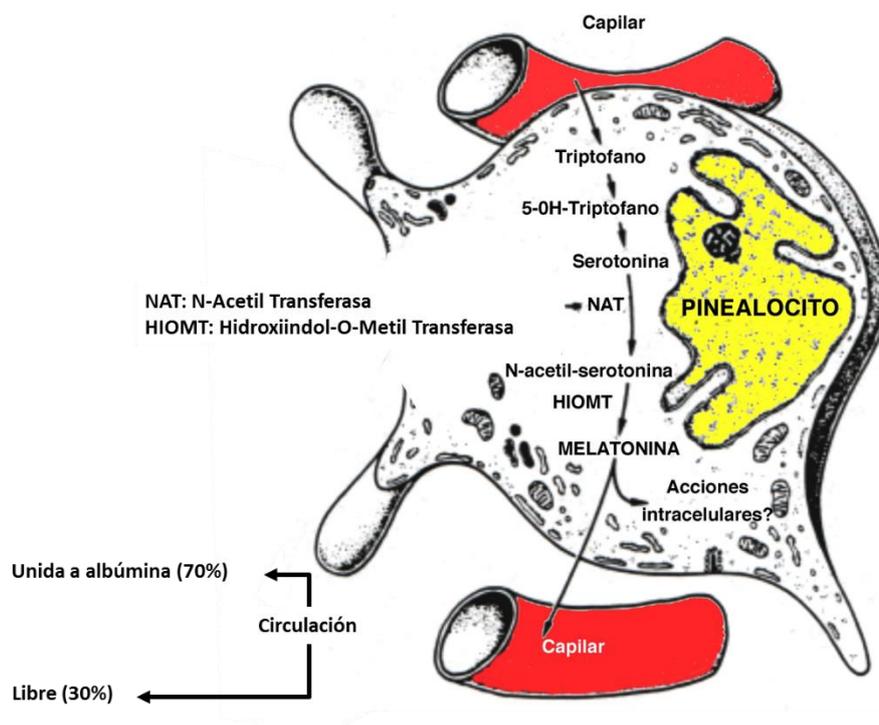


Figura 7. Esquema de la síntesis de la melatonina. Modificada de Díaz López et al. (1998).

La secreción de melatonina está modulada tanto por factores endógenos como por factores ambientales. En condiciones normales, la alternancia del día y la noche es el principal determinante del ritmo de secreción de melatonina. Además de los conos y bastones, Reiter et al. (2011) han caracterizado un tercer fotorreceptor, que son las células ganglionares

intrínsecamente fotosensibles de la retina (ipRGCs), cuya función es percibir la luz y transmitir esta información a través de la vía retino-hipotalámica al núcleo supraquiasmático (NSQ) y a la glándula pineal (figura 8). El NSQ es un grupo de neuronas del hipotálamo medial que regula los ritmos circadianos mediante la estimulación de la secreción de melatonina por la glándula pineal. Las neuronas del NSQ exhiben un patrón circadiano de actividad, siendo la luz el principal agente sincronizador medioambiental de este marcapasos endógeno. La NAT sólo permanece activa durante la noche por lo que la síntesis y liberación de melatonina se produce durante la oscuridad y se inhibe por la luz (Liebmann y cols., 1997). Existe un pico de concentración máxima en la primera mitad de la noche (02:00-04:00h) que decrece gradualmente durante la segunda mitad (Arakawa et al., 2014).

En situaciones de falta de señales externas, el ritmo de secreción de melatonina se corresponde con la actividad rítmica del marcapasos endógeno, los NSQ (Brooks et al., 2014). En la especie humana, la melatonina sigue un ritmo de secreción estacional y existen marcadas diferencias entre individuos de la misma edad y sexo en la amplitud, fase y cantidad total de melatonina que se secreta, pero una gran constancia en el patrón secretor de cada individuo (Trivedi et al., 2014).

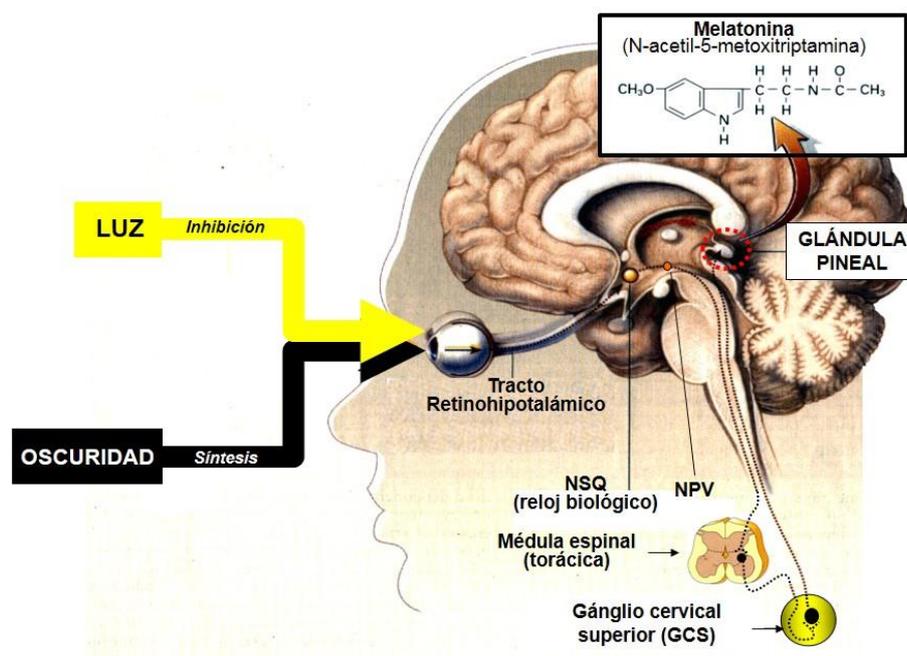


Figura 8. Vía retino-hipotalámico-pineal. La síntesis de melatonina en la glándula pineal está controlada por los NSQ, que están sincronizados con el ciclo luz/oscuridad a través del tracto retino-hipotalámico. Durante la noche, los NSQ envían señales neurales a través de una vía multisináptica simpática y la vía retino-hipotalámico-pineal. Modificada de Brzezinski (1997).

Introducción

Durante la gestación, el feto no secreta melatonina, sin embargo, la melatonina materna es transferida fácilmente al feto a través de la barrera placentaria (Klein, 1972; Okatani et al., 1998) y, gracias a su facilidad para cruzar la barrera hematoencefálica, llega rápidamente al cerebro (Serón-Ferré et al., 2012). El ritmo circadiano de la melatonina se establece hacia los dos meses de vida y sus niveles plasmáticos nocturnos aumentan con rapidez hasta alcanzar un pico a los 3-5 años. Después, la concentración plasmática de melatonina durante la noche disminuye para alcanzar valores mínimos en torno a la pubertad, estabilizarse a lo largo de la edad adulta (30-50 años) y reducirse de modo notable hasta la casi desaparición del ritmo día-noche durante la vejez (Pandi et al., 2013).

La mayor parte de la melatonina circulante es inactivada a nivel hepático formándose 6-hidroxi-melatonina sulfato que se excreta por la orina en forma de sulfatos (75%) o glucurónicos (5%) (Reiter et al., 1996). Otra fracción es transformada en el cerebro en forma de compuestos derivados de la quinurenamina (15%) y el resto se excreta en forma libre (Reiter et al., 1991).

4.2. Receptores de melatonina

La melatonina es una molécula pequeña de carácter lipofílico, aunque las características particulares de su estructura química también la hacen hidrosoluble. Por esta razón los mecanismos de acción de esta neurohormona son muy variados. En mamíferos, se han identificado al menos tres tipos de receptores de membrana para esta indolamina. Los receptores de alta afinidad MT1 y MT2 (Molinari et al., 1996) son receptores acoplados a proteínas G y están localizados en diversas estructuras del SNC como la corteza, tálamo, cerebelo e hipocampo. Por otro lado, el receptor MT3 no puede ser considerado un receptor en sentido estricto ya que se trata del enzima quinona reductasa 2 que se une a la melatonina con baja afinidad (Reppert et al., 1994).

Además, el carácter lipofílico de la melatonina le permite entrar fácilmente en la célula, llegar hasta al núcleo y unirse a receptores nucleares “huérfanos” pertenecientes a la superfamilia RZR/ROR (Reiter, 1991; Becker-André et al., 1994).

4.3. Acciones de la melatonina

El papel fisiológico de la melatonina en humanos aún no ha sido totalmente esclarecido, sin embargo, la amplia distribución de sus receptores configura un amplio espectro de posibles tejidos diana para esta hormona. La melatonina funciona a modo de señal química midiendo la duración del día y de la noche y el paso de las estaciones, lo que sugiere que su función está

principalmente relacionada con la regulación de los ritmos biológicos (Arendt, 1986). Sin embargo, también presenta otras acciones no circadianas que se asemejan a las de cualquier hormona como el control de la temperatura (Atkinson et al., 2005), la regulación de la respuesta inmune y antiinflamatoria (Trubiani et al., 2005; Dominguez-Rodríguez et al., 2012), la acción antineoplásica (Alvarez-García et al., 2012; 2013) y la acción antioxidante (Mayo et al., 2002, Kim et al., 2014).

En concreto, en este trabajo nos hemos centrado en sus **acciones neuroprotectoras**, que se describen en profundidad en la siguiente sección.

Papel neuroprotector de la melatonina

La melatonina, por su capacidad antioxidante y neuroprotectora, podría ser una potencial diana terapéutica en el tratamiento de algunas enfermedades neurodegenerativas. Diversos estudios clínicos de pacientes con EA han encontrado efectos beneficiosos tras el tratamiento con esta indolamina sobre la cognición, la sincronización de los ritmos circadianos, la regulación del ritmo sueño/vigilia y la disminución de la conducta agitada y la confusión. Estos resultados sugieren que la melatonina podría ser utilizada como tratamiento coadyuvante en la EA (Brusco et al., 1999; Mishima et al., 2000; Mahlberg et al., 2004; Cardinali et al., 2010; Srinivasan et al., 2010; Miller et al., 2014).

A nivel cognitivo-conductual, la melatonina también mejora la memoria y el aprendizaje en distintos modelos murinos que presentan disfunción colinérgica, incrementos en la expresión de la proteína APP o un aumento del estrés oxidativo cerebral (Matsubara et al., 2003; Feng et al., 2004a; 2006; García et al., 2009; Olcese et al., 2009; Dragicevic et al., 2011; García-Mesa et al., 2012; Zhang et al., 2013; Beřer et al., 2013). Además, el tratamiento con esta indolamina mejora la cognición en diversos modelos murinos de distintas neuropatologías, incluida la EA (Olcese et al., 2009; Yoo et al., 2012; Liu et al., 2013).

Una de las acciones que subyacen a estos efectos beneficiosos ejercidos sobre la cognición es su capacidad para reducir y neutralizar los radicales libres (Galano et al., 2011; 2013). La melatonina impide la sobreproducción de ROS y reduce el daño neuronal producido por estrés oxidativo (Jou et al., 2010; Hong et al., 2010; Das et al., 2010). Además, estimula la expresión de diversas enzimas antioxidantes, inhibe enzimas prooxidativas y produce una acción sinérgica con otros antioxidantes como la vitamina E, la vitamina C y el glutatión (Gitto et al.,

Introducción

2001; Feng et al., 2006; Pandi - Perumal et al., 2013). No obstante, la melatonina es más eficaz en la reducción del daño oxidativo que las vitaminas C y E (Tan et al., 2002).

Esta reducción de los niveles de estrés oxidativo también se debe a sus efectos sobre la función mitocondrial y producción de ATP (Acuña-Castroviejo et al., 2011). Así, la administración crónica de melatonina incrementa el número de mitocondrias en las células (Deker y Quay, 1982) y estimula la respiración mitocondrial en el cerebro de ratones con senescencia acelerada (Okatani et al., 2002; 2003).

Esta indolamina también reduce la formación del péptido A β , así como su agregación y neurotoxicidad (Acuña-Castroviejo et al., 2011). Además, se ha demostrado que la administración temprana de melatonina ejerce efectos protectores frente a la patología amiloide en ratones transgénicos para el gen *APP*, pero este efecto beneficioso no es evidente cuando el tratamiento comienza después de la formación de los depósitos amiloides (Song et al., 1997; Lahiri, 1999; Matsubara et al., 2003; Zhang et al., 2004). Además, también se ha demostrado que previene la fosforilación de la proteína tau (Lin et al., 2013).

Asimismo, la melatonina ejerce efectos beneficiosos sobre la neurogénesis hipocampal, ya que aumenta la proliferación, la diferenciación y la supervivencia neuronal (Kong et al., 2008; Moriya et al., 2007; Sotthibundhu et al., 2010; Ramírez-Rodríguez et al., 2012; 2014). Además, contribuye a la formación de nuevas neuritas y contactos sinápticos mejorando la plasticidad sináptica (Bellon, et al., 2007; Ramirez-Rodriguez et al., 2009; Domínguez-Alonso et al., 2012; Liu et al., 2013).

A nivel electrofisiológico, el tratamiento crónico con melatonina revierte los déficits en la inducción de LTP después de la inyección intra-hipocampal de A β (Liu et al., 2013). Además, la neurohormona aumenta la concentración de las subunidades 2A y 2B del receptor NMDA en el hipocampo de rata (Delibas et al., 2003; Talaei et al., 2010).

Por otro lado, la melatonina también ejerce un efecto protector sobre el sistema colinérgico (Guermonprez et al., 2001). Su administración crónica aumenta la actividad de las neuronas colinérgicas en un modelo de EA, el APP695 (Feng et al., 2004a) y la actividad de la enzima ChAT en ratas adultas ovariectomizadas (Feng et al., 2004b). Además, se ha comprobado que la combinación de inhibidores para la acetilcolinesterasa y melatonina tiene un efecto sinérgico en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa actuando de forma más potente y

selectiva que cuando se administran por separado (Fernández-Bachiller et al., 2009; Spuch et al., 2010).

Su papel neuroprotector también se debe a sus propiedades antiinflamatorias; esta indolamina reduce los niveles de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α inducidas por los péptidos A β (Rosales-Corral et al., 2003).

Por último, también tiene propiedades antiapoptóticas a través de la regulación de diversas proteínas implicadas en las cascadas de muerte celular (Tan et al., 2013).

Todos estos estudios demuestran que gracias a sus múltiples acciones neuroprotectoras, el tratamiento con melatonina podría tener un gran valor terapéutico para mejorar o retrasar las anomalías funcionales, neuromorfológicas y electrofisiológicas encontradas en el SD.

Objetivos

La presente tesis doctoral tiene como principal objetivo estudiar en qué medida el tratamiento con el antioxidante melatonina puede ser una **estrategia terapéutica** eficaz para paliar algunas de las alteraciones fenotípicas implicadas en la **discapacidad intelectual** propia del SD. Para ello, en este trabajo se analizarán los efectos de la administración crónica de melatonina durante las etapas pre- y post-natales y durante la etapa adulta sobre diversas alteraciones neuromorfológicas, electrofisiológicas y neurodegenerativas que juegan un papel importante en la aparición y posterior progresión del déficit cognitivo en un modelo murino de SD, el ratón TS.

Los **objetivos concretos** son:

1. Evaluar los **niveles endógenos** de melatonina en los distintos grupos de animales.
2. Evaluar los efectos de la administración crónica de melatonina, tanto durante la etapa adulta como durante las etapas pre- y post-natales, sobre los **déficits cognitivos y conductuales** que presentan los ratones TS. Para ello se analizaron los efectos del tratamiento crónico con esta indolamina sobre:
 - 2.1. Las **habilidades sensoriales y motoras**, la **actividad espontánea** en la prueba de la actimetría, la **ansiedad y actividad general** en las pruebas del campo abierto y laberinto en cruz y la **atención** en la prueba de la tabla de agujeros.
 - 2.2. Las alteraciones cognitivas: el **aprendizaje** y la **memoria espacial** en la prueba del laberinto acuático de Morris y el **aprendizaje asociativo** en la prueba de condicionamiento del miedo.
3. Profundizar en los **mecanismos neuromorfológicos, electrofisiológicos, sinápticos y protectores ante la neurodegeneración** que subyacen a las mejoras encontradas a nivel cognitivo-conductual en los ratones TS después del tratamiento crónico con melatonina durante la etapa adulta:
 - 3.1. Determinar los efectos de la administración crónica de melatonina sobre las alteraciones en la **neurogénesis hipocampal**: densidad de células proliferativas, densidad de células inmaduras en diferenciación, densidad de células granulares maduras.
 - 3.2. Determinar los efectos de la administración crónica de esta neurohormona sobre la conectividad sináptica cuantificando la densidad de botones **sinápticos excitadores e inhibitorios**.

Objetivos

- 3.3. Determinar los efectos del tratamiento con melatonina sobre las alteraciones en la **plasticidad sináptica** a través del análisis de la LTP.
- 3.4. Determinar los efectos del tratamiento crónico con melatonina sobre el inicio y la progresión de los distintos **procesos neurodegenerativos** que aparecen en el cerebro del ratón TS adulto deteriorando aún más la cognición:
 - 3.4.1. Evaluar los efectos de la administración crónica de melatonina sobre la **degeneración colinérgica del prosencéfalo basal**, a través de la cuantificación de las neuronas ChAT⁺.
 - 3.4.2. Evaluar los efectos de la melatonina sobre la **neuropatología de tipo Alzheimer** mediante:
 - El estudio de su efecto sobre el aumento de expresión de los **niveles de la proteína APP** en la corteza y el hipocampo.
 - El estudio de su efecto sobre los incrementos en los niveles de los **péptidos β -amiloides** (A β 40 y A β 42) en la corteza y en el hipocampo.
 - 3.4.3. Analizar los efectos de la administración de melatonina sobre los niveles de **estrés oxidativo** mediante la cuantificación de un metabolito de la peroxidación lipídica, el HNE, en la corteza y en el hipocampo.

Material y métodos

1. Animales de experimentación

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

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

Los ratones obtenidos, se estabularon en grupos de 2-3 animales hasta el momento de empezar los tratamientos farmacológicos en los que fueron estabulados individualmente en jaulas transparentes de Plexiglas (20x22x20 cm) a una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, un ciclo de 12 horas 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 las 8:00 P.M.), de modo que los estudios de comportamiento se llevaron a cabo durante el periodo activo de los ratones, es decir, durante la fase de oscuridad.

2. Genotipado de los ratones

En cada camada se obtuvieron entre 5 y 7 crías, de las cuales un 30-40 % aproximadamente fueron trisómicas. La similitud en cuanto al aspecto externo de los ratones TS y de sus hermanos con dotación cromosómica normal (CO) hace que estos animales sean difícilmente distinguibles. Con el fin de determinar la presencia de la trisomía, los animales fueron cariotipados mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) utilizando el protocolo descrito por Liu et al. (2003).

Además, dado que un determinado porcentaje de ratones C3H/HeSnJ poseen una mutación recesiva que puede dar lugar a una degeneración retiniana, se llevó a cabo una electroforesis del gen *Rd* para descartar los animales con dicha anomalía en el estudio conductual (Bowes et al., 1993).

2.1. Preparación de las muestras: extracción de DNA genómico de cola de ratón

Tras el destete de las crías (21 días) se recogieron muestras de cola de ratón (1-2 mm de longitud) y se introdujeron de manera individual en tubos de 1.5 ml de capacidad. Se añadieron 300 μ l de NaOH 50mM y se incubaron durante 30 minutos en un baño seco a 98°C. A continuación, las muestras se agitaron y se volvieron a incubar a 98°C hasta conseguir la digestión completa. Una vez finalizada la digestión, se añadieron 30 μ l de Tris 1M (pH=8) para neutralizar la reacción. Seguidamente, se centrifugaron durante 10 minutos a 13,000 r.p.m. (revoluciones por minuto) y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo para la cuantificación del DNA en el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) (A260). Finalmente, las muestras se diluyeron en H₂O_{mQ} hasta una concentración de 20 ng/ μ l.

2.2. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

Para identificar al ratón TS se utilizaron como marcadores los genes para la proteína precursora del β -amiloide (*App*) y de resistencia a mixovirus 1 (*Mx1*), ya que se encuentran situados cerca de los extremos proximal y distal, respectivamente, del segmento del cromosoma MMU16 triplicado en el ratón TS.

Como control interno y para normalizar las variaciones en la cantidad de DNA, se utilizó el gen de la apolipoproteína B (*ApoB*) que está situado en el cromosoma murino MMU12 y, por tanto, no se encuentra triplicado en el ratón TS.

Tabla 2. Primers y sondas utilizadas para la qPCR.

	<i>App</i>	<i>Mx1</i>	<i>ApoB</i>
Primer Forward	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'
Primer Reverse	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'-FAM-CAA AGG CGC CAT CAT CGG ACT CA-TAMRA-3'	5'-FAM-CTT TCC TGG TCG CTG TGC A-TAMRA-3'	5'-HEX-CCA ATG GTC GGG CAC TGC TCA A-TAMRA-3'

El objetivo consistió en detectar si en cada muestra había dos o tres copias de los genes *App* y *Mx1* y, de esta manera, identificar a los animales como CO o TS respectivamente. Para ello se añadieron a cada muestra: 8 μ l de DNA diluido (20 ng/ μ l), 10 μ l de 2x Taqman Universal PCR

Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), que incluye la DNA polimerasa y los dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato), 0.2 µl de cada primer o cebador a una concentración de 40 µM (Metabion, Martinsried, Alemania) y 0.6 µl de cada sonda a una concentración de 5 µM (Applied Biosystems) (tabla 2).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Mx3000P (Stratagene, CA, USA) y se utilizaron placas de PCR de 96 pocillos (Teknovas, Vizcaya, España) y película adhesiva óptica Micro Amp (Applied Biosystems). Los ciclos de amplificación se sucedieron de la siguiente forma: un primer ciclo a 50°C durante 2 minutos, un segundo ciclo a 95° durante 10 minutos, 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y un último ciclo a 60°C durante 1 minuto. Para cada muestra y cada gen las qPCRs se realizaron por duplicado.

2.3. PCR estándar para la identificación del gen *Rd*

Para identificar a los animales homocigotos para el gen *Rd* se utilizó el siguiente protocolo:

➤ *Amplificación por PCR*

Tabla 3. *Primers* utilizados para la realización de la PCR estándar.

<i>Rd</i>	
Primer Forward W149	5'-CAT CCC ACC TGA GCT CAC AGA AAG -3'
Primer Reverse W150	5'-GCC TAC AAC AGA GGA GCT TCT AGC -3'

Para cada muestra se añadió una cantidad determinada de DNA genómico (X µl) en función de la dilución de la muestra (dilución: 50-100 ng → cantidad a añadir: 2 µl-1 µl); 16.4-X µl (en función de la cantidad de DNA añadido) de H₂O_{mQ}; 4 µl de dNTPs 1.25 mM (dNTP mix, Takara, Otsu, Shiga, Japón); 2.5 µl de tampón 10x (10x Ex Taq Buffer, Takara); 1 µl de cada primer (Metabion) y 0.1 µl de Taq Polimerasa (Ex Taq, Takara). En el control negativo se sustituyó el DNA genómico por H₂O_{mQ}.

Los ciclos de amplificación fueron los siguientes: 35 ciclos de 3 minutos a 96°C, un ciclo de 30 segundos a 96°C, un ciclo de 30 segundos a 58°C, un ciclo de 45 segundos a 74°C y un último ciclo de 10 minutos a 74°C.

Material y métodos

➤ *Comprobación de la amplificación del DNA*

Para ello se llevó a cabo la migración de las muestras en un gel de agarosa al 2 % que contenía 2 g de agarosa, 100 ml de TBE 0.5 % (5 g/l de Tris; 2,752 g/l de ácido bórico; 2 ml de EDTA 0.5M, pH 8) y 4.5 µl de Red Safe (Intron Biotechnology, Seoul, Korea).

Se utilizó una cubeta de electroforesis horizontal (Bio Rad, Hercules, CA, USA), que contenía TBE 0.5 % y, a continuación, se cargó un pocillo con 5 µl de un marcador con fragmentos de DNA de distintos tamaños, desde 25 a 700 pares de bases (bp) (Gene Ruler Low Range DNA Ladder, Fermentas, Vilna, Lituania). En el resto de pocillos se cargaron 5 µl del producto de la PCR de cada muestra con tampón de carga (6:1). Se conectó la cubeta con la fuente de alimentación (Power Pac HC, Bio Rad) a 100V durante 30 minutos.

Para el revelado del gel se usó el lector Gel Doc (Gel Doc XR System, Bio Rad) acoplado a un ordenador con el software *Quantity One* (Bio Rad). El tamaño de la banda esperado para el gen *Rd* es de 298 bp.

➤ *Digestión con la enzima de restricción Dde I (Desulfovibrio desulfuricans enzime I)*

En un tubo eppendorf de 0.2 ml se añadieron 8 µl del producto de la PCR de cada muestra, 0.5 µl de la enzima de restricción Dde I (10 U/µl; Roche diagnostics, Mannheim, Alemania), 1 µl de tampón 10x para enzimas de restricción (Sure/Cut Buffer H for Restriction enzymes, Roche diagnostics) y 0.5 µl de H₂O_{mQ}. Se realizó la digestión durante 24 h a 37°C.

Para el control negativo, se sustituyeron 4 µl del producto de la PCR y los 0.5 µl de enzima Dde I por H₂O_{mQ}.

➤ *Migración en un gel de agarosa al 2 %*

Se corrieron y se revelaron los geles del mismo modo que se ha descrito en el punto 2 (comprobación de la amplificación del DNA). Para ello se utilizaron 10 µl del producto de la digestión. Los tamaños de bandas esperados para el genotipo salvaje (*wild type*, *wt*), heterocigoto (*wt/rd*) y homocigoto (*rd/rd*) se muestran en la figura 9:

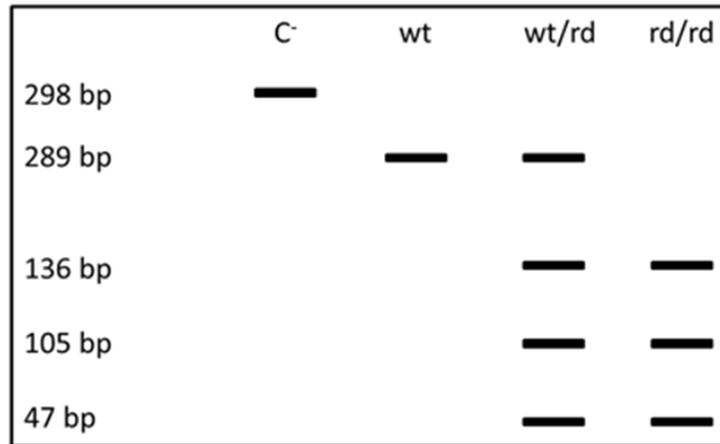


Figura 9. Tamaños de bandas esperados en los distintos genotipos existentes para el gen *Rd*.

3. Grupos experimentales y administración de melatonina

➤ ***Estudio I: Efectos del tratamiento crónico con melatonina durante la edad adulta sobre las alteraciones comportamentales, cognitivas, neuromorfológicas y electrofisiológicas y sobre la neurodegeneración del ratón Ts65Dn***

En este estudio, se trataron con melatonina o su diluyente (vehículo) ratones TS y controles (CO). La melatonina (Sigma-Aldrich, MO, USA) fue diluida en etanol absoluto y añadida al agua de bebida hasta una concentración final de 100 mg/l. La concentración final de etanol después de diluir la melatonina fue del 0.06 %. Los animales TS y CO del grupo vehículo recibieron agua con la misma concentración de etanol en los biberones de bebida. La solución de melatonina se renovaba cada 3-4 días en biberones de cristal debidamente protegidos de la luz. Dado que la ingesta media diaria de agua por ratón fue de 5 ml en todos los grupos experimentales, la ingesta media de melatonina se estableció en 0.5 mg de melatonina/día.

En este estudio se utilizaron 2 cohortes (tabla 4). La primera cohorte se empleó para evaluar el efecto de la administración crónica de melatonina sobre las alteraciones cognitivas, comportamentales (actividad, habilidades sensoriales y motoras y ansiedad) y neuromorfológicas de los ratones TS y CO. La segunda, para analizar el efecto de la administración crónica de esta indolamina sobre las alteraciones electrofisiológicas (LTP), el estrés oxidativo cerebral y los niveles del péptido β -amiloide en el hipocampo y en la corteza.

Tabla 4. Número de animales destinados a cada cohorte en el estudio I.

Cohorte	Experimento	Grupo experimental				Nº total ratones
		CO vehículo	CO melatonina	TS vehículo	TS melatonina	
I	Conducta	14	14	14	14	56
	Inmunohistoquímica	8	8	8	8	
	Western Blot APP	6	6	6	6	
II	Electrofisiología	12	12	12	12	48
	ELISA A β 40/42	6	6	6	6	
	ELISA estrés oxidativo	6	6	6	6	

Cohorte I

En la primera cohorte todos los animales (14 por grupo; tabla 4) tenían entre 5-5.5 meses de edad al inicio del tratamiento (figura 10) y entre 10-10.5 meses tras la realización de la batería de pruebas conductuales. Los animales recibieron melatonina o vehículo durante 16 semanas antes del inicio de las pruebas conductuales. Además, el tratamiento se mantuvo durante las 4 semanas que duró la batería conductual. Finalizada la batería de pruebas conductuales, se perfundieron 8 animales de cada grupo y los cerebros se utilizaron en los experimentos de inmunohistoquímica. Los 6 animales restantes de cada grupo siguieron con el tratamiento hasta los 12 meses de edad y posteriormente fueron sacrificados para medir los niveles de expresión de la proteína APP en la corteza y en el hipocampo.

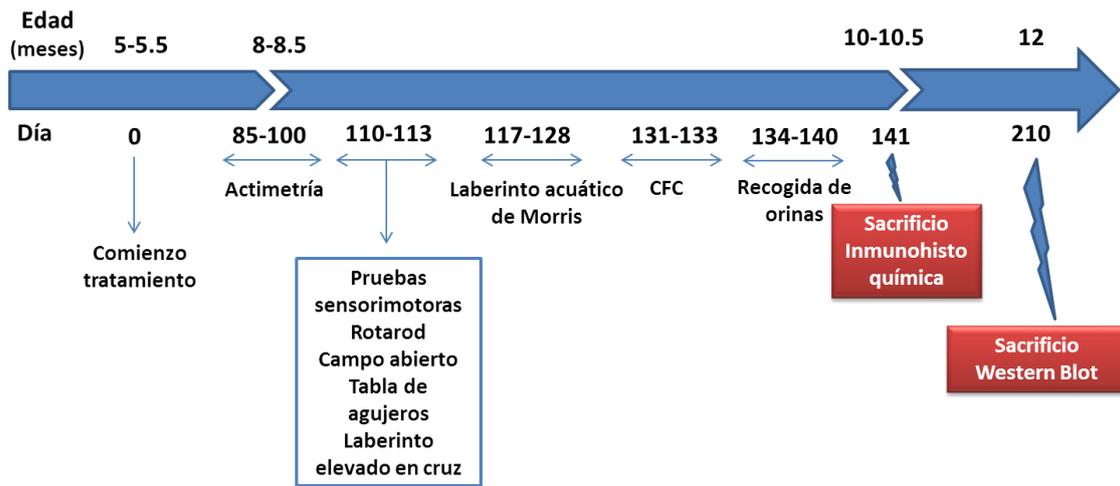


Figura 10. Protocolo experimental de la cohorte I de ratones TS y CO que recibió el tratamiento crónico con melatonina durante la edad adulta.

Cohorte II

En la segunda cohorte los animales (12 por grupo; tabla 4) fueron tratados desde los 6.5 meses de edad hasta los 12 meses, momento en el que se realizaron los estudios electrofisiológicos. De cada uno de los 12 animales de cada grupo, la mitad del cerebro se utilizó para realizar los experimentos electrofisiológicos y la otra mitad del cerebro (incluyendo el hipocampo y la corteza) se diseccionó y conservó a -80°C para llevar a cabo la determinación de los niveles de estrés oxidativo y de los péptidos β -amiloides mediante técnicas de inmunoensayo en 6 cerebros correspondientes a 6 animales distintos de cada grupo respectivamente.

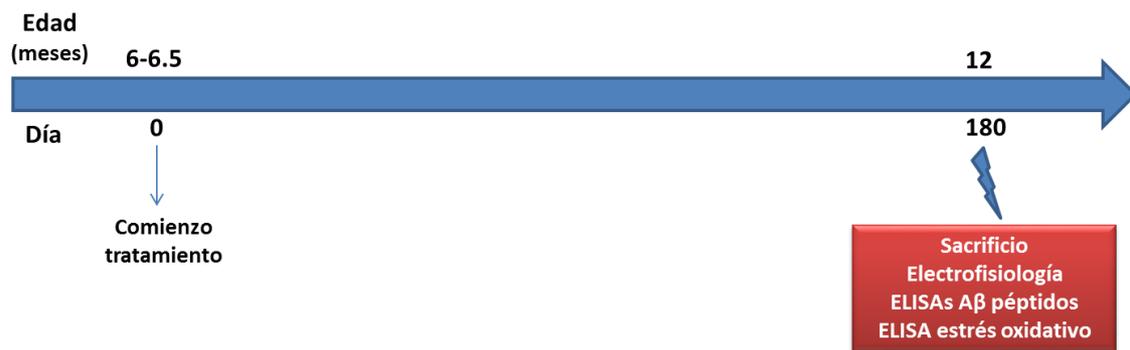


Figura 11. Protocolo experimental de la cohorte II de animales TS y CO que recibió el tratamiento crónico con melatonina durante la edad adulta.

➤ **Estudio II: Efectos del tratamiento crónico con melatonina durante las etapas pre- y post-natales sobre las alteraciones comportamentales y cognitivas del ratón Ts65Dn**

En este estudio se administró melatonina o vehículo por vía oral a las hembras gestantes desde el día de la concepción y durante todo el periodo de gestación y lactancia siguiendo la misma pauta de administración descrita en el estudio I. Después del destete, se trató a todos los machos de la descendencia hasta que empezaron las pruebas conductuales (4.5 meses) y durante todo el periodo que duraron las mismas (4 semanas), de tal manera que estuvieron recibiendo melatonina o vehículo a través de la leche de su madre o de la administrada directamente a ellos después del destete un total de 5.5 meses (figura 12).

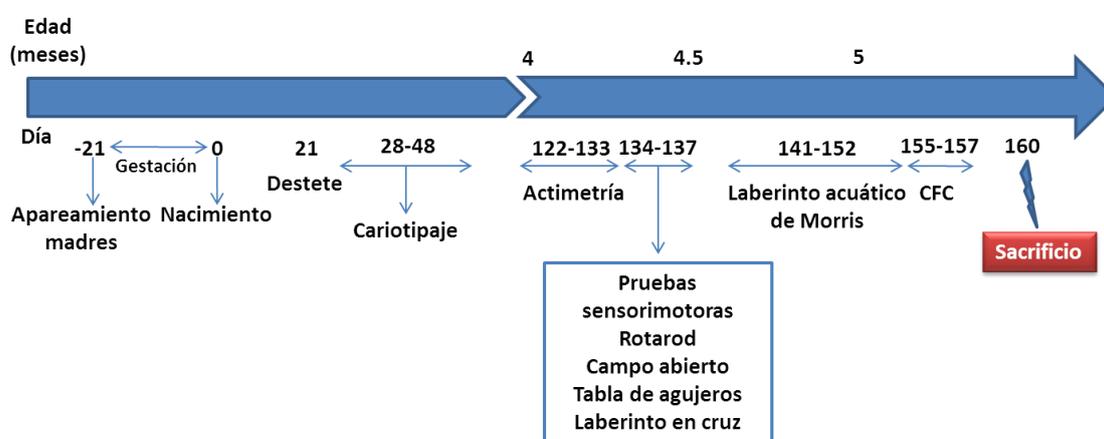


Figura 12. Protocolo experimental llevado a cabo en los animales TS y CO que recibieron el tratamiento crónico con melatonina desde la etapa pre-natal hasta la edad adulta.

4. Estudios conductuales

Con el fin de prevenir el sesgo, todas las pruebas conductuales se llevaron a cabo a ciegas respecto al tratamiento y genotipo.

4.1. Pruebas sensorimotoras

Para valorar las habilidades sensoriales y motoras de los animales se realizó una batería de pruebas siguiendo el procedimiento descrito por Martínez - Cué et al. (2013).

➤ **Respuesta de alcance**

Mediante esta prueba se valoró la función del cerebelo, sistema vestibular y laberinto 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 valoraba 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 los bigotes con 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.

➤ **Prueba de sensibilidad táctil**

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

➤ **Respuesta de sobresalto**

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

➤ **Reflejo de enderezamiento**

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

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

➤ **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 (figura 13). Ambas barras se situaron a 40 cm del suelo sujetando los extremos con unos soportes de 2 x 2 cm² que permitían al ratón colocarse sobre ellos en el caso de alcanzar alguno de los extremos. En ambas barras se marcó una zona central de 10 cm. Se realizaron dos ensayos de 20 segundos en cada barra empezando por la de madera y con un período de 2-4 minutos entre los ensayos. El ratón se depositaba en el centro de la barra, con las cuatro patas sobre ella. En caso de caída se anotaba la latencia en segundos. La puntuación fue: (0) si el animal caía antes de 20 segundos, (1) si se mantenía en la barra sin salir de los límites centrales, (2) si salía de la zona central sin llegar a los extremos y (3) si llegaba a los extremos. La puntuación máxima para cada una de las barras fue de (6).



Figura 13. Batería de pruebas sensorimotoras. A) Prueba de equilibrio sobre barra de madera, **B)** y sobre barra de aluminio. **C)** Prueba de la percha.

➤ **Reflejo prensil y capacidad de tracción**

Ambos parámetros se valoraron en un mismo ensayo. El ratón se colocaba 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. Se realizaron 3 ensayos de 5 segundos de duración cada uno con un intervalo entre ellos 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 el 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).

➤ **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. Se situó al ratón en el centro de la barra colgado por las patas delanteras. En un único ensayo de 60 segundos se midió: la latencia de caída, el número de desplazamientos (se consideró desplazamiento cuando el ratón cruzaba una de las zonas marcadas) y la latencia en llegar a uno de los extremos (figura 13C).

➤ **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 (UgoBasile, 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 dividida por 6 discos de plástico de 12 cm de diámetro que separan la barra 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 14). Este aparato tiene incorporados cinco contadores individuales de tiempo que se detienen cuando el animal cae del rodillo.

Se llevaron a cabo cuatro ensayos en una única sesión. En el primer ensayo se colocó al animal en el rodillo a una velocidad de 5 r.p.m. y se le entrenó para que permaneciera en el aparato durante un tiempo máximo de permanencia de 60 segundos. A continuación se realizaron otros dos ensayos de otros 60 segundos a velocidades constantes de 20 y 40 r.p.m. respectivamente. 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 40 r.p.m.) y el animal tenía que adaptarse a las crecientes exigencias de la prueba. El tiempo máximo de permanencia permitido era de 300 segundos, momento en el que se alcanzaba la velocidad máxima.



Figura 14. Prueba de coordinación motora: Rotarod.

➤ **Actividad espontánea: actimetría**

En esta prueba se evaluó la variación circadiana de la actividad locomotora de los animales en un ciclo completo de 24 horas (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) mediante unos actímetros (Inframot, TSE, Alemania). Este sistema consta de unos sensores infrarrojos que registran la actividad y los desplazamientos espaciales de los animales por la irradiación infrarroja que emite el calor corporal que se genera tras el movimiento. Se midió la actividad en 4 jaulas simultáneamente, una jaula bajo cada unidad sensora. Cada jaula contenía un animal de distinto grupo experimental y el comienzo de la medición fue aproximadamente en la segunda hora de la fase oscura del fotoperiodo (9 a.m.). Durante el tiempo que duró la recogida de datos se mantuvo la sala en silencio para evitar interferencias externas con la actividad. Se obtuvo un índice de actividad para cada jaula por hora que correspondía a un solo animal.

4.2. Actividad general y ansiedad: campo abierto y laberinto elevado en cruz

➤ **Campo abierto**

Para estudiar la actividad general y la ansiedad en el campo abierto se siguió el procedimiento descrito por Martínez - Cué et al. (2013).

El campo abierto consistía en una superficie cuadrada de 55 cm de lado rodeada de unas paredes de 25 cm de altura (figura 15). El aparato era de madera de color blanco. El suelo estaba dividido en 25 cuadrados de 11 cm de lado. En una única sesión de 5 minutos se midió la distancia recorrida por el centro y por la periferia del aparato y las incorporaciones (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 se analizó el tiempo, la distancia recorrida en centro y periferia del aparato y la velocidad de cada animal con el programa de análisis de imagen Anymaze (ANY-maze®, Stoelting CO, USA).

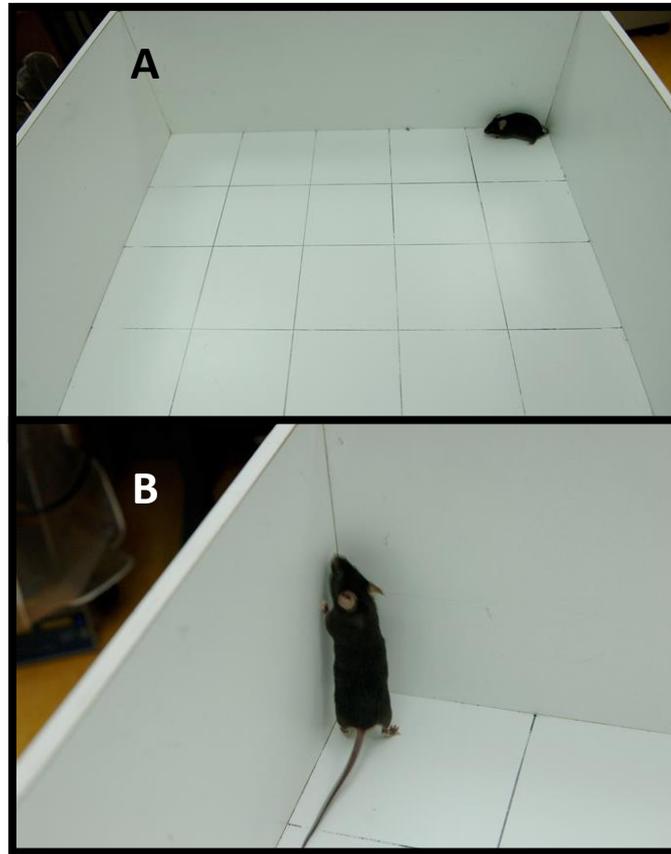


Figura 15. Prueba del campo abierto. En la imagen se puede observar a un ratón deambulando por la periferia (A) y realizando una incorporación (B).

➤ **Laberinto elevado en cruz**

Para valorar distintos parámetros relacionados con la ansiedad utilizamos la prueba del laberinto elevado en cruz siguiendo el protocolo descrito por Martínez - Cué et al. (2013).

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 40 cm sobre el suelo (figura 16). La prueba consistió en un único ensayo de 5 minutos en el que se colocó al ratón en el centro del aparato y se contabilizó el número de entradas y el tiempo que permaneció en los brazos abiertos y cerrados. Por otro lado, se analizaron los componentes cognitivos de la ansiedad, es decir, las conductas de defensa y de evaluación de riesgo que

Material y métodos

realizan los animales como son el número de alzamientos (*rearings*), las conductas de aproximación-retirada desde las zonas protegidas del laberinto (*stretch attend postures, SAP*) y el número de veces que asoman la cabeza por los brazos abiertos (*head-dippings*). Como criterio se consideró que la entrada a cada brazo se debía producir con las 4 patas. Todos los ensayos fueron grabados en vídeo y posteriormente se analizaron la distancia recorrida en brazos abiertos y cerrados y la velocidad de cada animal con el programa de análisis de imagen Anymaze (Stoelting).



Figura 16. Prueba del laberinto en cruz. En la imagen se puede observar al animal realizando un “head-dipping” (A), entrando a un brazo abierto (B) y realizando una conducta de aproximación-retirada (C).

4.3. Atención y actividad exploratoria: tabla de agujeros

Se evaluó la actividad exploratoria en la tabla de agujeros siguiendo el protocolo previamente descrito por Martínez - Cué et al. (2013).

El aparato consistió en una caja de madera (32 x 32 x 30 cm) con cuatro agujeros equidistantes de 3 cm de diámetro en el suelo (figura 17). 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 realizada en el aparato: distancia recorrida y el número de incorporaciones. Todos los ensayos fueron grabados en vídeo y posteriormente se analizó la distancia recorrida por cada animal con el programa de análisis de imagen Anymaze (Stoelting).

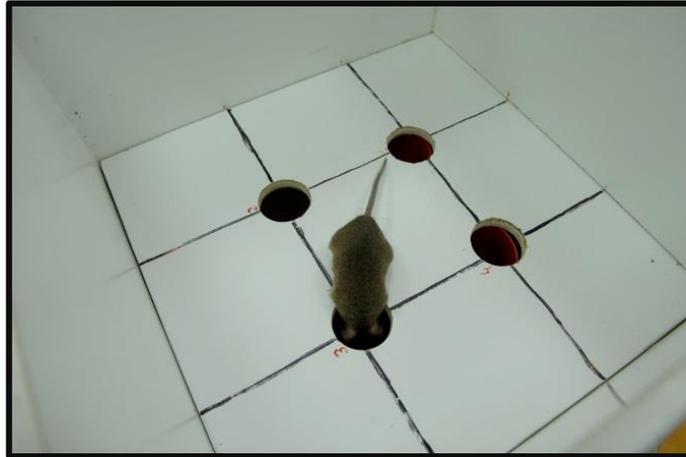


Figura 17. Prueba de la tabla de agujeros. En la imagen se observa un animal realizando una exploración o head dipping.

Para evaluar la atención de los animales se calculó el número de repeticiones de agujeros previamente explorados (índice ABA). Dado que el índice ABA está determinado por la exploración general, es decir, a más exploraciones, más repeticiones, este índice se corrigió dividiéndolo entre el número de exploraciones totales (ABA/número de exploraciones).

4.4. Aprendizaje y memoria: laberinto acuático de Morris y prueba de condicionamiento del miedo

➤ **Aprendizaje y memoria espacial: laberinto acuático de Morris**

La valoración del aprendizaje y la memoria espacial se realizó utilizando una versión modificada del laberinto acuático de Morris (*Morris Water Maze*, MWM; Morris, 1984). El modelo del laberinto de agua refleja la complejidad de la navegación espacial, mostrando cómo los animales se orientan eficientemente en el espacio mediante su capacidad de establecer y retener asociaciones entre estímulos ambientales. A pesar de tratarse de una tarea motivada aversivamente que causa cierto grado de estrés, lo que podría estar influyendo en su ejecución, este paradigma resulta muy útil para investigar los mecanismos neurobiológicos implicados en el aprendizaje y la memoria espacial.

El aparato consiste en un tanque metálico circular de 120 cm de diámetro que contiene agua teñida con dos litros de leche hasta una altura de 25 cm y a una temperatura constante de 22-24°C (figura 19). 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. Cada dos sesiones se cambió el agua del tanque.

Material y métodos

La versión utilizada en los dos estudios que incluye esta tesis consta de ocho sesiones de adquisición y cuatro sesiones de aprendizaje guiado (figura 18).

a) Sesiones de adquisición

En las sesiones de adquisición (S1-S8), la plataforma permaneció sumergida unos 2 cm por debajo del nivel del agua. Durante las sesiones de adquisición la posición de la plataforma variaba cada día entre cuatro posiciones posibles (E, SO, centro y NO, figura 18). En cada sesión de adquisición los animales realizaron 4 pares de ensayos con un total de 8 ensayos en cada una. 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.

Con este protocolo utilizado es posible valorar la **memoria de referencia**, analizando la ejecución de los ratones a lo largo de las sesiones (la media de todos los ensayos de cada sesión), ya que cada día la plataforma cambia de posición y los animales tendrán que aprender la nueva localización de la plataforma. Este protocolo también permite medir la **memoria de trabajo**, analizando la ejecución de los ratones a lo largo de todos los ensayos de una misma sesión (la media de cada ensayo en las 8 sesiones), ya que el animal busca la plataforma en los primeros ensayos, codifica su localización y la recuerda durante el resto de los ensayos de cada sesión. Así, la memoria de referencia es independiente de los ensayos y permite aprender el método general para la ejecución de la tarea. En cambio, la memoria de trabajo es una memoria temporal que depende de cada ensayo. Según van progresando las sesiones, el animal debe construir una representación estable o a largo plazo del entorno, es decir, un mapa de coordenadas, que puede ser considerado como el componente de memoria de referencia de la tarea, diferente de la representación de la posición más reciente en la que la plataforma estaba situada. Por último, a lo largo de las sesiones el animal debe aprender a inhibir conductas

inadecuadas, como evitar nadar cerca de las paredes del tanque (tigmotaxis) para localizar la plataforma y elegir otra estrategia más adecuada para su localización, que constituiría el **aprendizaje de procedimiento**.

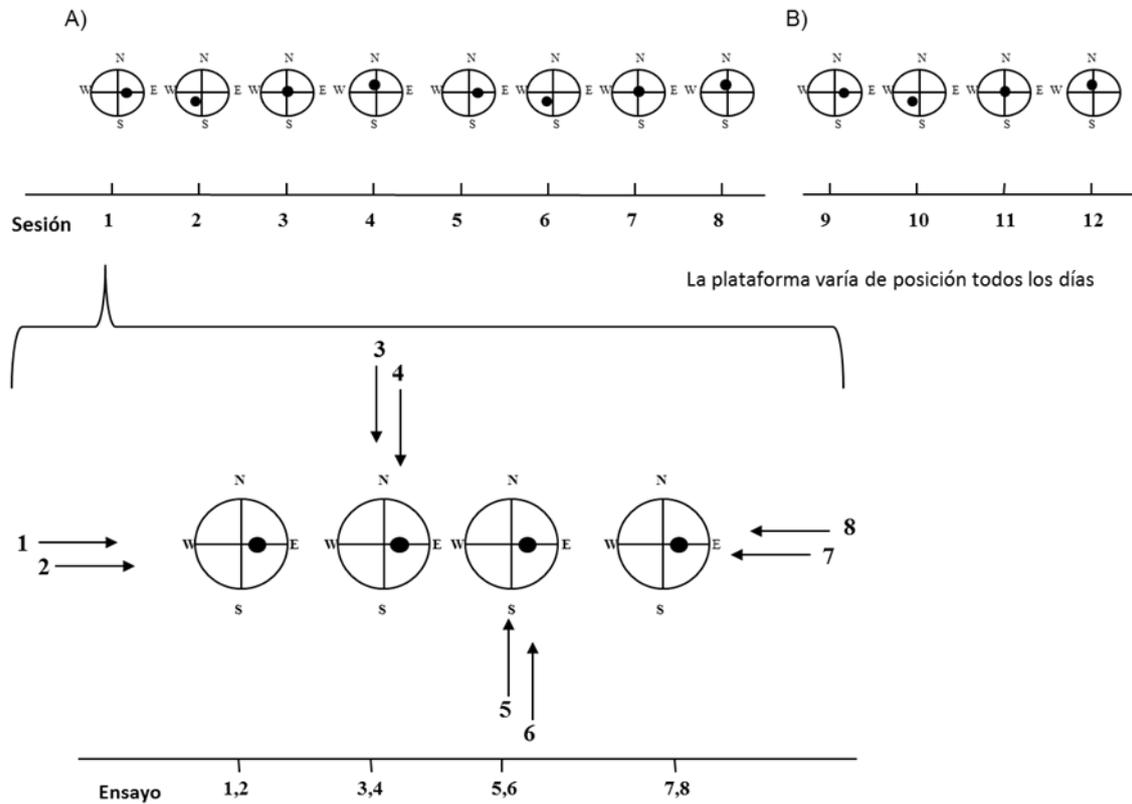


Figura 18. Esquema del protocolo utilizado en la prueba del laberinto acuático de Morris. **A)** Sesiones de adquisición y **B)** sesiones de aprendizaje guiado.

b) Sesiones de aprendizaje guiado

En las sesiones de aprendizaje guiado la plataforma era visible (el nivel de agua del tanque se situaba 2 cm por debajo de la plataforma, figura 19) y su posición se indicaba mediante una bandera de 9 x 5 cm de lado de colores llamativos situada sobre un mástil de 10 cm de altura colocado en una de las esquinas de la plataforma. Se realizaron 4 sesiones (sesiones 9-12) de 4 pares de ensayos cada una. El procedimiento experimental fue idéntico al empleado en las sesiones de adquisición.

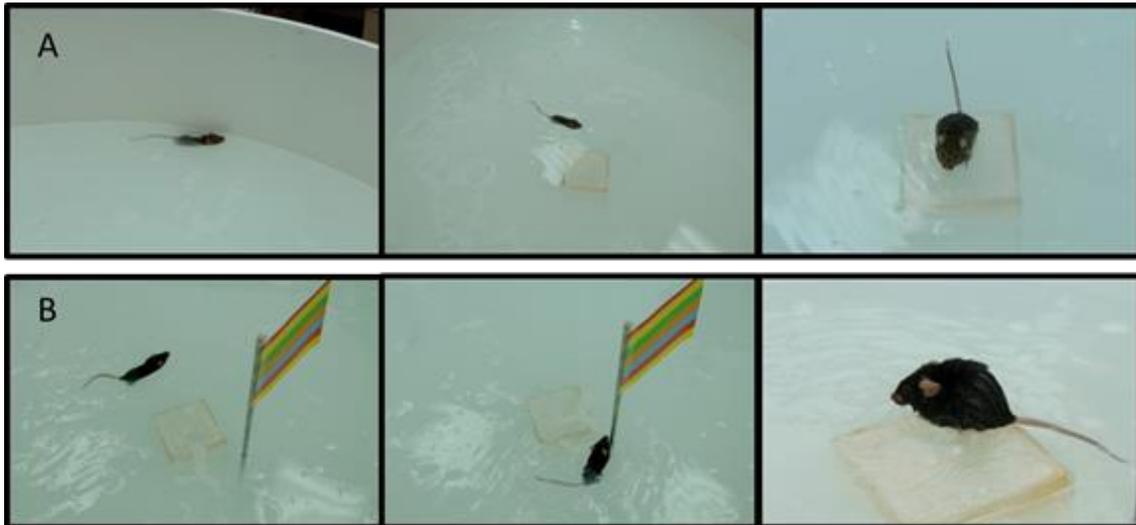


Figura 19. Prueba del laberinto acuático de Morris. **A)** Secuencia de una sesión de adquisición en la que el animal nada hasta encontrar la plataforma localizada 2 cm por debajo del nivel del agua. **B)** Secuencia en una sesión de aprendizaje guiado en la que la plataforma se encuentra por encima del nivel del agua y está señalada con una bandera.

➤ **Prueba de condicionamiento del miedo (Contextual Fear Conditioning, CFC)**

En esta prueba se utilizó el protocolo descrito por Salehi et al. (2009). Se realizó la prueba de condicionamiento de miedo a un contexto y a un tono mediante el sistema de condicionamiento de miedo de Stoelting (*Fear Conditioning Apparatus*, Stoelting) y el programa de seguimiento de vídeo Anymaze (Stoelting). El aparato consistía en una cámara insonorizada de dimensiones 44 x 54 x 54 cm con cuatro paredes que se podían cambiar de apariencia y un suelo de rejilla metálica a través de la que se podía administrar descargas eléctricas (figura 20).

La prueba constó de tres sesiones: una de entrenamiento, una de test de la asociación tono-descarga y una de test de la asociación contexto-descarga. En la primera sesión o de entrenamiento se dejó que los animales deambularan libremente por el aparato en el que se habían colocado paredes de franjas blancas y negras verticales durante 3 minutos (figura 20). A continuación se realizaron 5 ensayos de asociación tono-descarga. En cada uno de estos ensayos se emitió un sonido durante 20 segundos (70 dB, 2 kHz) y 18 segundos después se administró la descarga (0.5 mA, 50 Hz, 2 segundos). En la segunda sesión (test de asociación tono-descarga) los animales fueron colocados en el mismo aparato pero esta vez con un nuevo contexto (paredes de color gris liso) y se realizaron 3 ensayos. En cada uno de ellos se emitió un tono de las mismas características y duración que el día del entrenamiento, pero posteriormente no se les administraba descargas eléctricas. En la última sesión (test de asociación contexto-descarga), se colocó a los animales durante 5 minutos en el mismo contexto que durante la sesión de

entrenamiento (paredes con rayas blancas y negras verticales) y no se emitió ningún tono o descarga. Para evaluar la respuesta de condicionamiento de miedo se cuantificó el tiempo de inmovilidad (*freezing*) de los animales durante las sesiones 2 y 3 como medida de asociación entre el estímulo incondicionado (descarga) y los condicionados (tono en la sesión 2 y contexto en la sesión 3). El *freezing* se define como la ausencia total de movimiento corporal, excepto aquel requerido por la respiración.

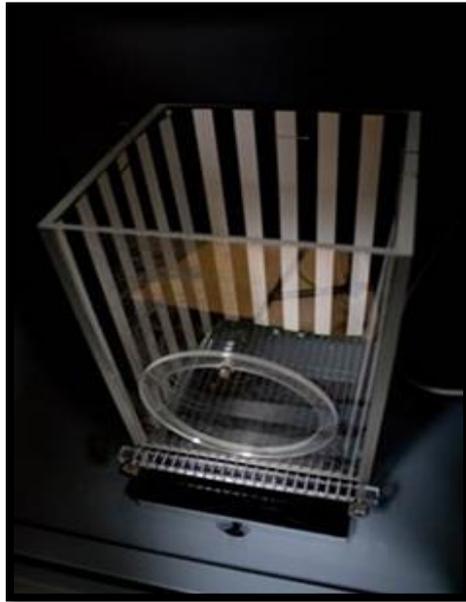


Figura 20. Fear Conditioning Apparatus. Urna de metacrilato en el interior de la cámara insonorizada con las paredes de franjas blancas y negras (sesión 1 y 3) y la rejilla a través de la cual se administran las descargas eléctricas (sesión 1).

5. Registro electrofisiológico de la actividad neuronal del hipocampo: potenciación a largo plazo (*Long Term Potentiation, LTP*)

La electrofisiología extracelular *in vitro* es una técnica que permite monitorizar los potenciales de acción (*output*) de poblaciones de neuronas concretas obtenidos tras la aplicación de un estímulo. En nuestro estudio, los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo en rodajas de hipocampo de un grosor determinado que permite mantener intacto el circuito trisináptico, que consta de tres vías principales a través de las cuales viaja la información hasta integrarse en el cerebro de forma permanente. La LTP es la base electrofisiológica del aprendizaje dependiente del hipocampo y nuestro interés se ha centrado en estudiar la transmisión sináptica de la vía colateral de Schaffer, que se proyecta desde las células de la región CA3 a las células piramidales de la región CA1 (figura 21). Para ello, se estimuló la vía colateral de Schaffer en la región CA1 y se registró la actividad eléctrica en la misma área CA1.

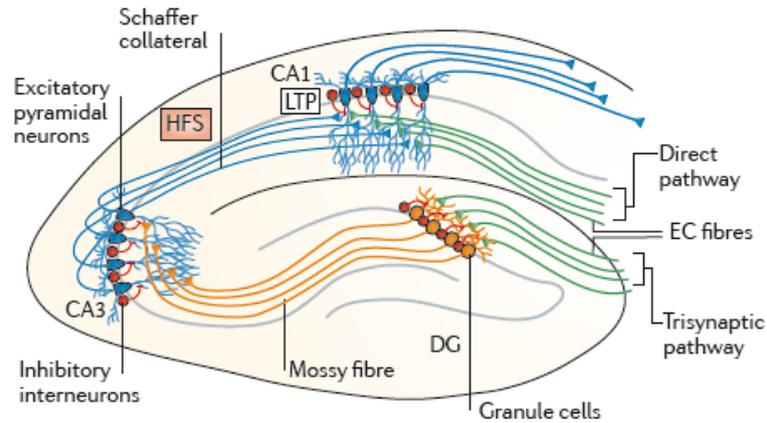


Figura 21. Circuito trisináptico del hipocampo. Se muestran las principales regiones del mismo (CA1, CA3 y DG) y se ejemplifican las tres sinapsis del circuito trisináptico. Modificada de Dierssen (2012).

La técnica consistió en inducir una LTP mediante la administración de un TBS (*Theta Burst Stimulation*) que consiste en un tren de estímulos que simula la excitación que tiene lugar en estas células durante los procesos de aprendizaje y memoria. Posteriormente, se registraron los potenciales postsinápticos excitatorios evocados (*field Excitatory Postsynaptic Potentials*, fEPSPs).

➤ *Obtención de las rodajas de hipocampo*

Los animales fueron rápidamente sacrificados por decapitación, se extrajo el cerebro, se diseccionó el hipocampo de uno de los hemisferios cerebrales y se seccionó con un *chopper* (Proquinorte, Bilbao, España) para obtener rodajas transversales de 400 μm , que fueron transferidas a una placa de Petri con líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial (NaCl 120 mM, KCl 3.5 mM, NaH_2PO_4 1.25 mM, MgSO_4 1.3 mM, CaCl_2 2.5 mM, glucosa 10 mM y NaHCO_3 26 mM, pH 7.5) oxigenado (95 % O_2 , 5 % CO_2) donde se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 hora antes de comenzar los registros electrofisiológicos.

➤ *Fabricación de electrodos de registro*

Los electrodos utilizados para registrar la actividad eléctrica se fabricaron a partir de micropipetas de borosilicato de 1 mm de diámetro (WPI, Worcester, MA, USA) obtenidas mediante un estirador vertical automático de pipetas (Scientific Instrument Lab., Narishige, Japan). La longitud y formas óptimas de la punta del electrodo se obtuvieron aplicando una intensidad de calor de 4.5 y una fuerza magnética de 0. El electrodo se rellenó con NaCl 3M (1-4 M Ω) y se conectó al sistema de amplificación.

➤ *Inducción de LTP en el área CA1 del hipocampo*

Para evaluar los efectos del tratamiento crónico con melatonina sobre la LTP hipocampal se utilizó una modificación del protocolo descrito por Costa y Grybko (2005).

Se transfirió una rodaja de hipocampo a una cámara de perfusión (Harvard Apparatus, ciudad, USA) donde se mantuvo a una temperatura de 30°C con un flujo constante de LCR oxigenado de 1 ml/minuto. Para estimular la vía colateral de Schaffer se situó un electrodo bipolar de estímulo en el *stratum radiatum* del área CA1 del hipocampo, mientras que el electrodo de registro se situó a unas 600 - 800 μ m del electrodo de estímulo en la región CA1 para registrar los fEPSPs (figura 22).

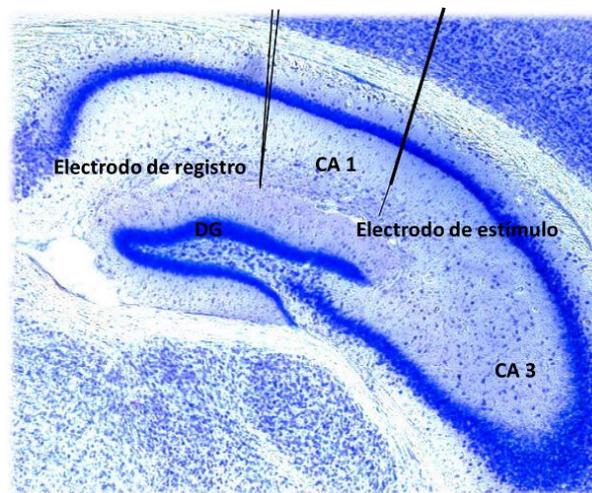


Figura 22. Esquema de la posición de los electrodos de estímulo y de registro en el hipocampo durante el registro de la LTP.

El proceso de registro constó de tres fases:

1) Establecimiento de la línea basal: para ello se aplicaron pulsos (100 μ s) con una frecuencia de 0.033 Hz (1 pulso cada 30 segundos) durante 20 minutos.

2) La potenciación a largo plazo fue inducida por un TBS que consistió en la aplicación de una serie de trenes de pulsos con elevada frecuencia. Se aplicaron 10 trenes de 5 pulsos (100 μ s, 100 Hz) con 200 ms entre el inicio de cada tren de pulsos.

3) Aplicación de los parámetros de la condición basal: 1 pulso (100 μ s) cada 30 segundos (0.033 Hz) durante 80 minutos.

Material y métodos

La respuesta neuronal obtenida, en forma de señal eléctrica, fue visualizada gracias a un osciloscopio (HM302-2, Hameg GmbH, Frankfurt, Alemania), recogida y amplificada (AC-DC Amplifier AE-2, Cibertec, Madrid, España) hasta 100 veces. En el proceso de amplificación, la señal se filtró para eliminar las frecuencias demasiado bajas (<1 Hz) y demasiado altas (>3 KHz). La señal fue digitalizada (CED Micro 1401, CED Limited, Cambridge, England) y registrada en un ordenador con el programa Spyke2 5.04 (Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, UK). Las pendientes de los fEPSPs se expresaron como porcentajes de cambio respecto a los valores de referencia registrados durante el establecimiento de la línea base.

6. Estudios de inmunohistoquímica

6.1. Preparación de tejidos

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (pentobarbital sódico 20 mg/ml, etanol 10 %, propilenglicol 20 %), sacrificados y perfundidos por vía intracardiaca, primero con salino (0.9 %) y luego con paraformaldehído al 4 %, pH 7.0, en PBS 1X (PBS 10X: NaCl 80 g/l, KCl 2 g/l, Na₂HPO₄ 6.1 g/l). Se utilizó para este procedimiento 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.

Se realizaron secciones coronales de 50 µm de grosor en criostato de todo el hipocampo y de 30 µm de grosor de todo el septo medial. Los cerebros fueron depositados en solución crioprotectora (etilenglicol 25 %, glicerol 25 %, PBS 1X 50 %) y almacenados a -20°C hasta su uso.

6.2. Tinción de Nissl

Para calcular el área de la zona subgranular (SGZ) de cada animal (método de Cavalieri), se llevó a cabo una tinción Nissl en una de las nueve series de hipocampo elegida aleatoriamente. Para ello, se montaron las secciones sobre portas gelatinizados (sin cubrirlos) y se dejaron secar 48 horas. Después, los portaobjetos fueron sumergidos durante 12 minutos en azul de toluidina, un colorante que se une al RNA contenido en los ribosomas, y por tanto tiñe el núcleo, el nucléolo y los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso. A continuación, se realizó un lavado breve en agua destilada y se procedió a la fase deshidratación, en la que se sumergieron las muestras durante 2 minutos en cubetas sucesivas con soluciones de alcoholes

de gradación ascendente (70°, 96° y dos baños de 100° respectivamente). Después se pasaron por dos baños sucesivos con el disolvente orgánico xileno, también durante 2 minutos. Finalizada la exposición, las muestras se cubrieron con la resina sintética DPX (Distrene 80, Platicizer, Xylene, DPX, medio de montaje rápido, base tolueno; Panreac, Barcelona, España) y un cubreobjetos y se dejaron secar durante 2 días.

Posteriormente, se realizaron fotografías del DG de cada una de las secciones incluidas en cada porta, empleando el microscopio óptico (Zeiss Axioskop 2 plus, Carl Zeiss Microscopy, LLC, Estados Unidos) con un objetivo de 4x (figura 23). A continuación, se midió la longitud de la SGZ con la ayuda del software ImageJ NIH (versión 1.33, NIH, Bethesda, MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij>) y de una tableta digital (Mouse Pen 8x6, Genius) de cada uno de los cortes contenidos en una serie.

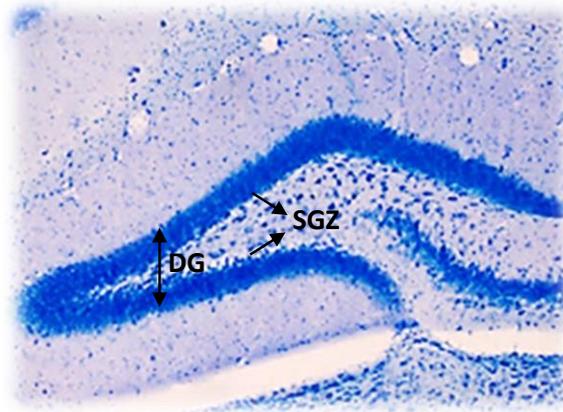


Figura 23. Imagen de microscopía óptica (4x) de una sección de DG con tinción de Nissl en la que se aprecia la SGZ.

Dado que el grosor de los cortes de hipocampo fue de 50 μm y el número total de series por hipocampo fue 9, la separación entre dos secciones consecutivas de la misma serie quedó establecida en 450 μm . Posteriormente se calculó el área total de la SGZ aplicando la siguiente fórmula:

$$A_{SGZ} = T \cdot \sum L_i;$$

donde T es igual a 450 μm o 0.45 mm y $\sum L_i$ el sumatorio de todas las longitudes de SGZ medidas en cada uno de los cortes de una serie.

6.3. Técnicas de inmunohistoquímica

➤ *Inmunofluorescencia*

Las técnicas de inmunohistoquímica con fluorescencia se basan en el uso de anticuerpos secundarios conjugados con complejos fluorescentes que se visualizan con el microscopio de fluorescencia o con el microscopio confocal.

En los estudios de proliferación y diferenciación neuronal en el hipocampo, se utilizaron varios anticuerpos primarios que marcaban o se unían a distintas poblaciones celulares (figura 24). Para identificar la densidad de células en proliferación en la SGZ se utilizó un anticuerpo anti Ki67 (tabla 5), una proteína nuclear que se expresa en las células proliferativas en todas las fases del ciclo celular activo (G1, S, G2 y M) y está ausente en las células con ciclo celular inactivo (G0). Para la identificación de distintas poblaciones de neuroblastos en diferenciación o neuronas inmaduras en el DG se realizó una doble inmunohistoquímica con anticuerpos anti doblecortina (DCX) y anti calretinina (CLR; tabla 5). DCX es una proteína asociada a microtúbulos que se expresa en los estadios iniciales de diferenciación, cuando las neuronas comienzan a extender sus dendritas. Posteriormente, comienza la expresión de CLR, una proteína de unión al calcio que se expresa transitoriamente en células granulares post-mitóticas que presentan fenotipo neuronal pero que aún se encuentran en proceso de diferenciación y no han alcanzado un fenotipo de neurona madura.

Por lo tanto, el doble marcaje con DCX y CLR nos permite identificar distintas poblaciones neurogénicas en el DG:

- DCX⁺/CLR⁻ → precursores neurogénicos.
- DCX⁺/ CLR⁺ → neuronas post-mitóticas en diferenciación.
- DCX⁻/CLR⁺ → población algo más diferenciada que las anteriores y que corresponde con un período demasiado corto, por lo que el número de estas neuronas es muy bajo.

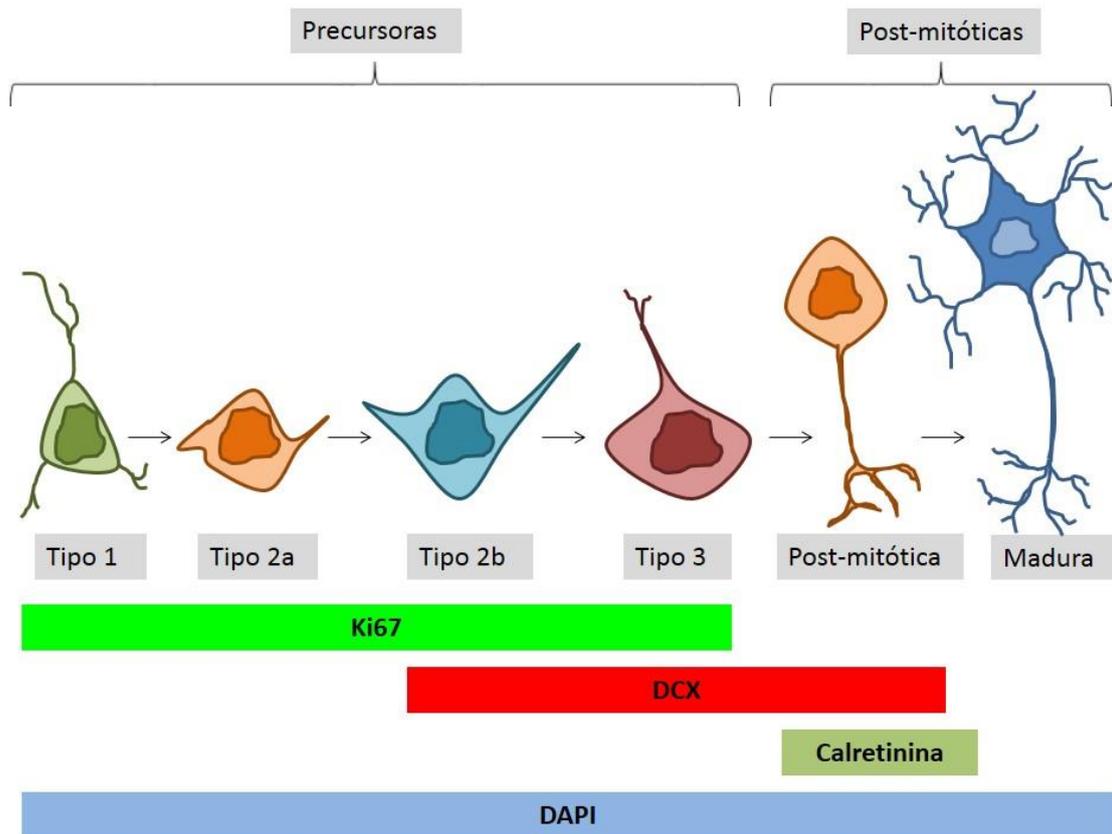


Figura 24. Ciclo vital de los precusores granulares del giro dentado. Desde su nacimiento en la SGZ del DG del hipocampo hasta que finaliza el proceso de diferenciación neuronal, la progenie del precursor granular avanza a través de una serie de etapas secuenciales. Como se observa en esta imagen, podemos distinguir cada uno de los estadios atendiendo a criterios morfológicos y a la expresión de ciertos marcadores característicos de cada etapa.

Para identificar neuronas granulares maduras en la capa de células granulares (*Granular Cell Layer, GCL*), se utilizó el marcador DAPI, un marcador nuclear que se une a las regiones de alta repetición A=T del DNA en los cromosomas y que al excitarse con luz ultravioleta produce fluorescencia azul.

Por último, para identificar botones sinápticos inhibitorios y excitadores en la capa molecular (*Molecular Layer, ML*) del DG se utilizaron anticuerpos anti-GAD65 y anti-VGLUT1, respectivamente (tabla 5). El primero de ellos es un marcador pre-sináptico de una de las isoformas de la Descarboxilasa de Ácido Glutámico (GAD) que cataliza la conversión de ácido γ -aminobutírico (GABA), el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro. El segundo, es un marcador que corresponde al Transportador Vesicular de Glutamato 1 (VGLUT 1), el neurotransmisor excitador más abundante del SNC de mamíferos. Ambos marcadores no colocalizan y permiten conocer el balance inhibitorio-excitador de los *inputs* que conectan con las células granulares a nivel de la ML.

Material y métodos

Con todos estos marcadores se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con Alexa (tabla 5).

Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en las técnicas de inmunofluorescencia

Inmunofluorescencia	Anticuerpos primarios	Anticuerpos secundarios
Ki67	Rabbit monoclonal anti-Ki67 (1:750) Neo Markers, UK	Donkey anti-rabbit Alexa Fluor® 488- conjugated IgG, (1:1,000) Molecular Probes, Eugene, OR, USA
DCX/CLR	Goat polyclonal anti-Doublecortin (1:250) Santa Cruz, USA	Donkey anti-goat Alexa Fluor® 594- conjugated IgG (1:1,000) Molecular Probes, Eugene, OR, USA
	Rabbit polyclonal anti-Calretinin (1:3,000) Swant, Suiza	Donkey anti-rabbit Alexa Fluor® 488- conjugated IgG (1:1,000) Molecular Probes, Eugene, OR, USA
VGLUT1/GAD65	Guinea pig polyclonal anti-Vesicular Glutamate Transporter (1:2,500) Chemicon, Temecula, CA, USA	Goat anti- guinea pig Alexa Fluor® 488- conjugated IgG (1:1,000) Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	Mouse monoclonal anti-Glutamic Acid Decarboxylase 65 (1:50) Chemicon, Temecula, CA, USA	Donkey anti-mouse Alexa Fluor® 594- conjugated IgG (1:1,000) Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

El protocolo general utilizado para la inmunohistoquímica de fluorescencia es una modificación del descrito por Llorens-Martín et al. (2006). En primer lugar, se seleccionaron aleatoriamente una de las nueve series de hipocampo cortadas previamente. Los cortes se lavaron con PB 0.1 M (PB 0.1 M: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.65 g/l, K_2HPO_4 14 g/l) y, a continuación, se preincubaron con PBTBSA durante 5 minutos: PB 0.1M con tritón (Tritón X-100 Electrophoresis Reagent, Sigma-Aldrich, MO, USA) al 1 % para permeabilizar el tejido; y con albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA, Sigma-Aldrich, MO, USA) al 1 %, para bloquear las uniones inespecíficas. Después se incubaron las secciones con el anticuerpo primario en PBTBSA (500µl/pocillo) en agitación sobre un orbital durante 1 hora a temperatura ambiente y, posteriormente, durante 72 horas a 4°C. En los casos en los que se realizó doble inmunohistoquímica, los tejidos fueron incubados con los 2 anticuerpos primarios al mismo tiempo (tabla 5). Una vez finalizada la incubación, se realizaron 5 lavados con PBTBSA. A continuación, se incubaron las secciones con el anticuerpo secundario correspondiente en cada

caso en PBTBSA en agitación sobre un orbital durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente durante 24 horas a 4°C. Al igual que con el anticuerpo primario, en los casos en los que se realizó doble inmunohistoquímica los tejidos fueron incubados con los 2 anticuerpos secundarios al mismo tiempo (tabla 5). Una vez finalizado el periodo de incubación se realizaron 3 lavados con PB 0.1 M y se incubaron los tejidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato, DAPI (Calbiochem, San Diego, CA, USA) 1:1000 en PB 0.1 M en agitación sobre un orbital durante 12 minutos a temperatura ambiente. Después, se realizaron 3 lavados con PB 0.1 M. Para eliminar la autofluorescencia debida a la acumulación de lipofuscina (lipopigmento que se encuentra en altas concentraciones en ratones de edad avanzada o con signos de envejecimiento temprano, como el ratón TS) se llevó a cabo un tratamiento con el reactivo Autofluorescence Eliminator Reagent (Millipore, Billerica, MA, USA) a todos los tejidos. Para ello se incubaron las secciones durante 5 minutos en etanol al 70 % y a continuación se incubaron con el reactivo previamente descrito durante 5 minutos. Se realizaron 3 lavados de 1 minuto con etanol al 70 % y otros 3 lavados con PB 0.1 M. Por último, se montaron los cortes en portaobjetos, ordenados desde la parte más rostral a la más caudal del hipocampo y se cubrieron con cubreobjetos utilizando gerbatol (glicerol 0.3 g/ml; Mowiol 0.13 g/ml; Tris-HCl 0.2 M pH 8.5 al 66 %).

➤ *Inmunohistoquímica con DAB. Detección de neuronas colinérgicas.*

Esta técnica precisa un sistema enzimático que utiliza la peroxidasa que, en presencia de una sustancia que actúa como cromógeno, cambia de color en el lugar de la reacción, permitiendo así la visualización de las estructuras a estudiar mediante microscopía óptica.

Para la identificación de neuronas colinérgicas, se utilizó un anticuerpo que se une a la enzima acetilcolina transferasa (*Choline Acetyl Transferase*, ChAT) que participa en la síntesis de acetilcolina y es específico de las terminaciones nerviosas colinérgicas.

Primero se seleccionó al azar una de las seis series de septo medial que habían sido cortadas previamente y se realizaron 3 lavados en PBS 1X con tritón al 0.2 % (PBS-Tx) para permeabilizar el tejido. A continuación, se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3 % en PBS-Tx durante 10 minutos y después se realizaron 3 lavados con PBS-Tx. Para bloquear las uniones inespecíficas se preincubaron las secciones con 20 % de suero normal de burro (*Normal Donkey Serum*, NDS, Chemicon International, MA, USA) en PBS-Tx durante, al menos, 45 minutos en agitación orbital. Después se realizaron 3 lavados con PBS-Tx y se incubaron las secciones con el anticuerpo primario (*Goat polyclonal anti-Choline Acetyl Transferase*, 1:100,

Material y métodos

Millipore) en PBS1X-Tx con NDS al 10 % durante 24 horas a temperatura ambiente en agitación orbital. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBS-Tx y se incubaron las secciones con un anticuerpo secundario biotilado (*Rabbit anti-goat Biotinilated IgG*, 1:250, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) en PBS-Tx con NDS al 5 % en agitación orbital durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS-Tx y después se trataron las secciones con el complejo Avidina-Biotina Peroxidasa (Standard Vecstain ABC Kit, Vector Laboratories) durante 45 minutos a temperatura ambiente y en agitación orbital. Al finalizar este periodo se realizaron 3 lavados con PBS1X sin tritón. El revelado de estos complejos se puso en marcha utilizando la especificidad de la reacción de peroxidación en presencia del cromógeno 3,3'- diaminobenzidina (DAB). Se añadió peróxido de hidrogeno (H₂O₂) como sustrato de la peroxidasa descomponiéndose en O⁻ y H₂O. Esta reacción de oxidación del DAB se manifiesta como depósitos de color marrón en los lugares específicos donde haya tenido lugar la reacción entre antígeno y anticuerpo. Cuando se visualizó la reacción, se lavaron los tejidos con PB 0.1 M. Finalmente, se montaron las secciones, ordenadas desde la zona más rostral a la más caudal y se dejaron secar al aire durante 48 horas. Una vez secados, los portas fueron deshidratados con alcoholes a diferentes concentraciones y xileno y se cubrieron utilizando DPX.

6.4. Recuentos celulares y técnicas estereológicas

6.4.1. Cuantificación de la proliferación celular en la SGZ del DG (Ki67)

La cuantificación de células Ki67 positivas se llevó a cabo usando el método del disector óptico descrito previamente por Llorens-Martín et al. (2006). El conteo de células se realizó mediante un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioskop 2 plus, Carl Zeiss Microscopy, LLC, U.S.A) con el objetivo de 40x a lo largo de toda la SGZ. Para la obtención de la densidad se dividió el número total de células obtenido para una serie entre el área de SGZ previamente calculado por serie como se indica en el apartado 6.2.

6.4.2. Cuantificación de distintas poblaciones de neuronas inmaduras en proceso de diferenciación en el DG (DCX/CLR)

Para calcular la densidad de distintas poblaciones de neuronas inmaduras en proceso de diferenciación en la SGZ se utilizó el método del disector físico previamente descrito por Llorens-Martín et al. (2006) acoplado al microscopio confocal (Leica TCS SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

En cada animal, se seleccionaron aleatoriamente seis puntos (stacks) de la SGZ donde se ubicaron los disectores. En cada punto, la superficie de referencia era un cuadrado de $100.01 \mu\text{m} \times 100.01 \mu\text{m}$ con un lado paralelo a la línea de la SGZ. Para tomar las fotografías en el microscopio confocal se utilizó un objetivo de 63x, un zoom de 2.46 y una resolución de 1024×1024 . A continuación, en cada punto seleccionado, se tomó una serie de 11 imágenes ($Z=17.204 \mu\text{m}$), asegurándose de que la distancia entre dos imágenes consecutivas fuera lo suficientemente próxima como para que cada célula apareciera al menos en dos planos sucesivos (en este caso $1.72 \mu\text{m}$).

El método estereológico para el recuento de estas poblaciones neuronales, que presentan una distribución irregular, fue el disector en forma de U. Dentro de cada stack, el recuento de las células se realizó en el plano Z, excluyendo de los contajes las células que tocaban la parte inferior y dos de los lados del stack (considerándolo como un cubo). Esto se realizó tomando pares de imágenes y considerando alternativamente una imagen como sección de referencia y la otra como sección de muestra. A continuación, la imagen de muestra se convertía en la imagen de referencia de la siguiente pareja de imágenes y así sucesivamente. Cuando una célula era contada, seguidamente se marcaba con el fin de evitar que fuese contada más de una vez en la serie de imágenes confocales. Se contaron las células DCX positivas, CLR positivas y positivas para ambos marcadores con ayuda del software de análisis de imagen Image J. La densidad de las distintas poblaciones de neuronas inmaduras fue expresada como células DCX positivas y CLR positivas, incluyendo dentro de este último grupo las células positivas para los dos marcadores y las células positivas solo para la CLR.

Para calcular la densidad celular por área de referencia de cada animal (figura 25) se dividió el número de células de cada población contadas entre el área de la SGZ contenida en el disector.

Neuronas inmaduras

Densidad media de células/ stack = n° células contadas/área stack

Área stack = $X*Z$

Figura 25. Fórmula para calcular la densidad de neuronas inmaduras.

6.4.3. Cuantificación de neuronas granulares maduras en el DG (DAPI)

La cuantificación de las células granulares maduras, que presentan una distribución regular a lo largo del DG se llevó a cabo usando el método del disector físico acoplado al microscopio confocal (Leica TCS SPE, Leica Microsystems) previamente descrito por Llorens-Martín et al. (2006). El disector se aplicó a series teñidas con DAPI.

En cada animal, se seleccionaron aleatoriamente seis stacks en el interior de la capa granular donde se ubicaron los disectores. Para tomar las fotografías en el microscopio confocal se utilizó un objetivo de 63x y un zoom de 2.3, con una resolución de 1024 x 1024. En cada stack, se tomaron una serie de 10 imágenes confocales (X=75.91 μm , Y=75.91 μm , Z=7.175 μm), siendo la distancia entre dos planos sucesivos de 0.8 μm .

Las imágenes del confocal fueron analizadas en el ordenador con la ayuda del software Image J. El recuento de las células se realizó a lo largo del eje de la Z utilizando el disector en U, tal y como se describe en el apartado anterior. El número de células granulares obtenido se refirió al volumen de referencia del disector (este parámetro es el volumen del prisma que se calcula multiplicando el área del marco de conteo por la altura del disector). Mediante la división del número de células contadas entre el volumen del disector se estimó la densidad celular por volumen de referencia (figura 26).

<p style="text-align: center;">Neuronas maduras</p> <p>Densidad neuronas maduras/stack = n° células contadas/volumen stack</p> <p>Volumen stack = X*Y*Z</p>
--

Figura 26. Fórmula para calcular la densidad de neuronas maduras.

6.4.4. Cuantificación de botones Glutamatérgicos y GABAérgicos en la ML del DG

Para cuantificar la densidad de botones GABAérgicos (GAD65⁺) y glutamatérgicos (VGLUT1⁺) se tomaron imágenes con el microscopio confocal (Leica TCS SP5, Leica Microsystems), utilizando el objetivo de 63x con un zoom de 9 y una resolución de 512 x 512. Para cada marcador, se seleccionaron aleatoriamente 4 puntos en la ML del DG, en la zona más externa de la capa de células granulares. En cada punto se tomó una imagen.

El análisis de las imágenes se realizó con la ayuda del software Image J. Ambos marcadores nunca colocalizan. Para determinar el área ocupada por botones con

inmunofluorescencia positiva para VGLUT1 y GAD65 se realizó un círculo de referencia con un área de $325 \mu\text{m}^2$. Las imágenes se convirtieron previamente a escala de grises para detectar con mayor exactitud la señal y diferenciarla del ruido de fondo. Ambos marcadores se midieron por separado, aplicando el mismo umbral para todas las imágenes y los resultados se expresaron como porcentaje del área de referencia ocupada por botones VGLUT1 y GAD65 positivos en cada caso.

6.4.5. Cuantificación de neuronas colinérgicas (ChAT) en el septo medial del prosencéfalo basal

La estimación cuantitativa del número total de neuronas ChAT-positivas en el septo medial se determinó con la ayuda de un microscopio óptico (Zeiss Axioskop 2 plus, Carl Zeiss Microscopy) y un objetivo 20x. El método de conteo fue similar al descrito por Kai-Hua Guo et al. (2014). Se realizaron fotos de cada uno de los cortes de la serie y con la ayuda del software Image J se llevó a cabo la cuantificación de todas las células ChAT-positivas en una mitad del septo medial, marcando las células previamente contadas para evitar repetir su conteo y, a continuación, se estimó el número total de células multiplicando el resultado por dos.

7. Inmunodetección de APP mediante Western Blot

Para la detección de la proteína APP mediante la técnica de Western Blot se siguió el método descrito por Rueda et al. (2010).

➤ Preparación de lisados

Los animales fueron decapitados bajo anestesia con pentobarbital sódico (50 mg/kg). Se extrajeron los cerebros y se diseccionaron las cortezas e hipocampos sobre hielo. Las muestras fueron homogeneizadas con un politrón en un tampón para lisados, en un volumen de 1 ml para las cortezas y 300 μl para los hipocampos. El tampón de lisis contenía: Tris-HCl 50mM, pH: 7.5, EDTA 1mM, duodecil sulfato sódico (SDS) 2 %, inhibidores de proteasas (4-(2 aminoacetyl)-benzeconsulfonil fluoruro 1.3 mM), leupeptina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, E-64 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, antipaina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e inhibidores de fosfatasas (cantaridita 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM). Posteriormente se hirvieron durante 10 minutos, se sonicaron y se centrifugaron durante 5 minutos a 10,000 g. Se recogió el sobrenadante y se calcularon las concentraciones de proteína mediante el método de Lowry et al. (1951). Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.

Material y métodos

➤ Electroforesis de proteínas

Se mezclaron cantidades idénticas de proteína (7 µg) de cada lisado con 5 µl de tampón de carga 5x (Tris 150 mM, pH 6.8, glicerol 50 %, SDS 1 % (p/v), β-mercaptoetanol 5 % y azul de bromofenol 0.25 %) y se completaron hasta un volumen total de 10 µl con PBS-SDS 1 %. La mezcla se calentó a 90°C durante 5 minutos y se centrifugó 5 minutos a 3,000 r.p.m. Para la separación de proteínas por electroforesis las muestras se cargaron en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Los geles utilizados son sistemas de tampón discontinuo (tabla 6), en los que una primera zona corresponde al gel de concentración de la muestra, no restrictivo, en el que se construyen los pocillos para la carga de las muestras. A continuación, está el gel de separación, que se comporta como un tamiz a través del cual las proteínas migran a una velocidad inversamente proporcional a su masa, y directamente proporcional al tamaño del poro que forma la acrilamida al polimerizar.

En cada gel se cargaron 5 µl de un marcador estándar de peso molecular adecuado para la determinación de la banda electroforética correspondiente a la proteína de estudio. El marcador utilizado (Bio-Rad) consta de 8 proteínas preteñidas con azul de bromofenol que abarcan un rango entre 6.4 y 195.6 kDa. En un primer momento, hasta que las muestras alcanzaron el gel de separación, se aplicó a la cubeta de electroforesis durante 15 minutos una corriente continua de 100 V, incrementándose posteriormente hasta 160 V, durante 50 minutos. Todo este proceso se realizó en tampón de electroforesis (Tris base 25 mM, pH 8.5, glicina 0.2 M, SDS 0.1 %).

Tabla 6. Composición de los geles de concentración y de separación.

Componentes	Gel de separación 10 %	Gel de concentración
H ₂ O destilada	5,000 ml	1,562 ml
40% Acrilamida-bisacrilamida	2,500 ml	313 µl
Buffer de separación 4X	2,500 ml	
10% persulfato amónico (APS)	150 µl	42 µl
Temed	7.5 µl	7.5 µl
Buffer de concentración 4X		625 µl
Rojo fenol		5 µl

➤ *Electrotransferencia*

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

➤ *Incubación con el anticuerpo primario y secundario*

Una vez finalizada la transferencia, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos del anticuerpo, incubando las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución bloqueadora, que contenía leche en polvo desnatada al 5 % en tampón TBS-T (Tris-HCl 0.02 M, pH 7.6, NaCl 0.15 M, Tween 20 0.05 %). Posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo primario anti-APP (1:2,000, Chemicon Internacional) en TBS-T, durante 24 horas a 4°C y en agitación.

Posteriormente, se realizaron cuatro lavados de 10 minutos cada uno en tampón TBS-T y se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario anti-ratón (1:40,000, Chemicon Internacional) diluido en TBS-T con leche en polvo desnatada al 5 % durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario se encuentra unido covalentemente a peroxidasa de rábano. Tras la incubación, se realizaron 5 lavados de 10 minutos con TBS-T.

➤ *Detección de la inmunoreactividad y cuantificación densitométrica*

La detección de la inmunoreactividad se realizó mediante el sistema de quimioluminiscencia amplificada utilizando los kits comerciales ECL Advanced (Amersham-Biosciences, Arlington Heights, IL, USA) y mediante el sistema de visualización Image Quant 350-GE (Healthcare, Barcelona, Spain). Los valores de densidad óptica se obtuvieron por medio del programa Scion Image (Scion Frederick, MD, USA). Los resultados fueron expresados como porcentaje de variación respecto al valor medio de densidad óptica de los animales CO dentro de cada gel. Las variaciones relativas entre las bandas de ratones TS y CO se calcularon para cada uno de los geles y cada muestra se analizó por duplicado en al menos tres experimentos independientes. Para corregir posibles errores de carga en el gel, las membranas también fueron

incubadas con un anticuerpo contra GAPDH (1:2000; Santa Cruz Biotechnology). Así, los valores de APP fueron normalizados con las estimaciones de esta proteína constitutiva.

8. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA*)

La determinación de la concentración de los péptidos A β 40 y A β 42 o de los metabolitos (4-hidroxinonenal, 6-sulfatoximelatonina) objeto de estudio, se llevó a cabo mediante un Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) en fase sólida.

Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo tras una incubación de dos horas. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así, cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base, que lo retiene, y un segundo anticuerpo, que se encuentra a su vez enlazado a una determinada enzima capaz de generar un cambio de color en la muestra (figura 27). Después de añadir el sustrato de la enzima a cada pocillo, el color de la muestra evoluciona en función de la concentración del antígeno problema, de manera que las muestras que contienen una mayor cantidad de antígeno obtienen un color más intenso que aquellas cuya concentración es menor. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo. Finalmente, se añade la solución requerida para parar la reacción y se determina la densidad óptica de cada pocillo en un lector de placas.

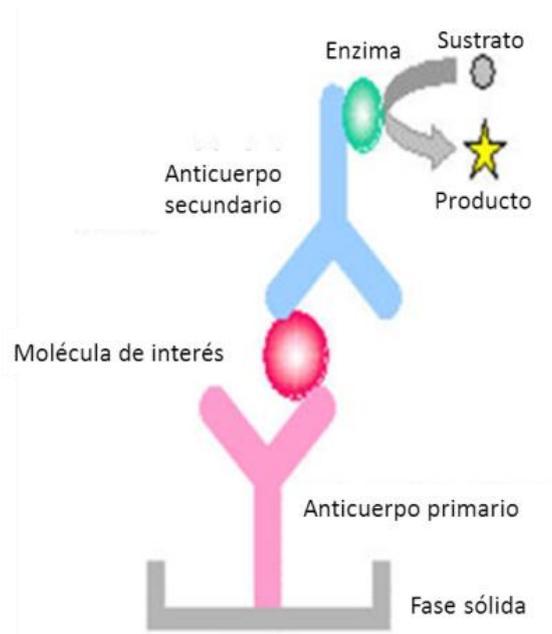


Figura 27. Esquema del Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas. Modificada de <http://dc184.4shared.com/doc/goS0-D6B/preview.html>

La cuantificación de la concentración de la molécula de interés en cada muestra se realizó mediante la elaboración de una recta de calibrado. Para ello, se añadieron a la placa de ELISA concentraciones conocidas de la molécula a cuantificar por duplicado. Las muestras de la curva patrón se procesaron de manera idéntica a las muestras problema.

Para elaborar la recta estándar se representó la media de los valores obtenidos en la lectura de la densidad óptica frente a la concentración de la molécula en cuestión y se elaboró una recta de regresión lineal cuyo coeficiente de regresión r^2 fue siempre superior a 0.99. La determinación de la concentración de antígeno en cada muestra problema se realizó por extrapolación, en la recta de calibrado, de la medida de la densidad óptica registrada en cada caso con ayuda de la ecuación obtenida para la recta estándar. Cada experimento se realizó por duplicado y las muestras se analizaron también por duplicado en cada experimento.

8.1. Inmunodetección de los péptidos amiloides A β 1-40 y A β 1-42 en el hipocampo y la corteza cerebral

La medición de los niveles de A β 1-40 Y A β 1-42 en el hipocampo y la corteza de los animales se llevó a cabo a través de dos kits ELISA (KMB 3481 y KMB 3441, respectivamente; Invitrogen, CA, USA).

Material y métodos

Los hipocampos y las cortezas fueron pesados y homogeneizados en un tampón de guanidina hidroclicídica 5M 8x (pH 8.0) y se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente. Las muestras se diluyeron con un tampón estándar de dilución (1:10) y se centrifugaron a 16,000 g durante 20 minutos a 4°C para separar el material insoluble. Posteriormente se recogió el sobrenadante y se almacenó a -80°C. Para medir los niveles de los péptidos β -amiloides se siguió rigurosamente el protocolo indicado por el proveedor. La densidad óptica se determinó en un lector de placas (Multiskan EX, Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) a una longitud de onda de 450 nm.

8.2. Inmunodetección de 4-hidroxinonal (HNE) en hipocampo y corteza cerebral

Los productos finales de la peroxidación lipídica, como el HNE, son uno de los marcadores más utilizados para medir el daño oxidativo. El HNE puede originar modificaciones proteicas causando cambios estructurales y funcionales en las proteínas oxidadas.

Para cuantificar los niveles de peroxidación lipídica, se midió la cantidad de HNE en el hipocampo y en la corteza de los animales mediante el Kit de ELISA (OxiSelect™ HNE Adduct ELISA Kit, STA-338, Cell Biolabs Inc., CA, USA) que detecta complejos HNE-proteína.

Las muestras de tejido fueron homogeneizadas en PBS 1X con inhibidor de proteasas a una concentración de 1:100 (Protease Inhibitor Cocktail Set III, Cat. Nº 539134, Calbiochem) y centrifugadas a 12,000 g durante 10 minutos. Posteriormente se recogió el sobrenadante y se almacenó a -80°C. La concentración de proteína de cada una de las muestras fue determinada a partir del método de Lowry et al. (1951) y las muestras se diluyeron a una concentración final de 10 μ g/ml. La cuantificación de los niveles de HNE se llevó a cabo siguiendo las indicaciones proporcionadas por el proveedor. La densidad óptica se determinó en un lector de placas (Multiskan EX, Thermo Electron) a una longitud de onda de 450 nm.

8.3. Cuantificación de los niveles del metabolito 6-sulfatoximelatonina (aMLTs) en orina: ensayo por inmunoabsorción competitiva

Con un fundamento similar al del ELISA, este ensayo está basado en el principio de la competencia, es decir, una cantidad desconocida de antígeno presente en la muestra y una cantidad fija de antígeno, marcado enzimáticamente, compiten por los sitios de unión de los anticuerpos que recubren los pozos. Tras la reacción del sustrato, los pozos se lavan para detener la reacción de competencia. En este caso, la intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno de la muestra.

En los mamíferos, la mayor parte de la melatonina circulante es metabolizada en el hígado a 6-hidroximelatonina. Este metabolito es excretado en la orina bajo forma sulfatada (6-hidroximelatonin sulfato o 6-sulfatoximelatonina). Por lo tanto, la concentración de este metabolito en orina correlaciona bien con los niveles de melatonina en sangre.

Las orinas se recogieron en recipientes, con la ayuda de jaulas metabólicas específicas de ratón (Tecniplast, Lombardía, Italia). El volumen total de orina excretada por cada ratón fue recogido al finalizar la fase oscura (08:00-20:00) y al final de la fase luminosa (20:00-08:00) de un ciclo completo de 24 horas. Las muestras fueron centrifugadas y, a continuación, se llevó a cabo la determinación cuantitativa de los niveles del metabolito 6-sulfatoximelatonina en orina, empleando el kit Melatonin Sulfate ELISA (IBL International GMBH, Hamburgo, Alemania). La cuantificación de los niveles de 6-sulfatoximelatonina se llevó a cabo siguiendo las indicaciones proporcionadas por el proveedor. La densidad óptica se determinó en un lector de placas (Multiskan EX, Thermo Electron) a una longitud de onda de 450 nm.

9. Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics versión 21.

➤ *Pruebas conductuales*

Los datos del Laberinto Acuático de Morris se analizaron usando un MANOVA de Medidas Repetidas ('sesión' x 'genotipo' x 'tratamiento' o 'ensayo' x 'genotipo' x 'tratamiento'). Los datos del resto de estudios conductuales se analizaron mediante un análisis múltiple de la varianza (MANOVA) de dos vías ('genotipo' x 'tratamiento') para evaluar el efecto de varios factores sobre una variable dependiente. Las medias de cada grupo experimental fueron comparadas *post hoc* mediante pruebas *t* de Student o Pruebas Bonferroni, según se tratara de dos o más grupos.

➤ *Inmunohistoquímica*

El análisis estadístico de todos los experimentos de inmunohistoquímica se realizó mediante un MANOVA de dos vías ('genotipo' x 'tratamiento'). Las medias de cada grupo experimental se compararon *post-hoc* mediante pruebas *t* de Student y pruebas Bonferroni según se tratara de dos o más grupos.

Material y métodos

➤ *Western Blot y ELISAs*

El análisis estadístico que se utilizó fue un MANOVA de dos vías ('genotipo' x 'tratamiento'). Las medias de cada grupo experimental se compararon *post-hoc* mediante pruebas *t* de Student o pruebas de Bonferroni, según si se tratara de dos o más grupos.

➤ *Electrofisiología*

El análisis de los registros electrofisiológicos se realizó con ayuda del programa Spike2. Las pendientes de los fEPSPs se expresaron como porcentajes de cambio respecto a los valores de referencia registrados durante el establecimiento de la línea base. Los resultados de cada grupo experimental se expresaron como media \pm E.E.M. El análisis estadístico se realizó mediante un MANOVA de medidas repetidas ('tiempo' x 'tratamiento' x 'genotipo'). Las medias de cada grupo experimental se compararon *post-hoc* mediante pruebas *t* de Student y pruebas Bonferroni según se tratara de dos o más grupos.

Resultados

1. ESTUDIO I: Efectos del tratamiento crónico con melatonina durante la edad adulta sobre las alteraciones comportamentales, cognitivas, neuromorfológicas y electrofisiológicas y sobre la neurodegeneración del ratón Ts65Dn

1.1. Análisis de los niveles de melatonina en orina

Los niveles de melatonina en orina se midieron a partir del metabolito 6-hidroximelatonin sulfato o 6-sulfatoximelatonina (aMLTs), como medida indirecta de la secreción cíclica de melatonina por la glándula pineal.

Como se muestra en la tabla 7, todos los grupos experimentales mostraron una mayor secreción de melatonina durante la fase de oscuridad (08:00-20:00 h) que durante la fase de luz (20:00-08:00 h). Los ratones TS y CO que fueron tratados con melatonina tuvieron valores de aMLTs significativamente mayores que los animales tratados con vehículo, durante ambas fases del fotoperiodo (tabla 7). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en los niveles excretados de aMLTs por ratones TS o CO bajo el mismo tratamiento (melatonina o vehículo) durante la misma fase del ciclo luz/oscuridad.

Tabla 7. Medias \pm E.E.M. de los niveles de aMLTs excretados durante el día y la noche en los distintos grupos experimentales y valores F y p del MANOVA (genotipo x tratamiento) de cada variable dependiente analizada. Los valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$) se presentan en negrita.

Concentración de aMLTs	Vehículo		Melatonina		F _{1,28}		
	CO	TS	CO	TS	Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
ng/12-h luz	0.057 \pm 0.02	0.152 \pm 0.07	29.85 \pm 7.53	28.35 \pm 6.00	0.01, p=0.89	27.72, p<0.001	0.02, p=0.88
ng/12-h oscuridad	0.495 \pm 0.38	2.95 \pm 1.64	107.7 \pm 25.18	122.41 \pm 23.59	0.41, p=0.52	31.70, p<0.001	0.26, p=0.61

1.2. Efectos sobre la cognición, ansiedad, atención y habilidades sensorimotoras del ratón TS

1.2.1. Cognición

1.2.1.1. Prueba de condicionamiento del miedo (CFC)

En esta prueba se valoró el efecto del tratamiento crónico con melatonina o vehículo sobre la memoria dependiente e independiente del hipocampo. Para ello se evaluó la capacidad de los animales para asociar una pequeña descarga eléctrica a un tono (memoria independiente del hipocampo, sesión 2) y a un contexto visual (memoria dependiente del hipocampo, sesión

Resultados

3). En la figura 28 se muestra el tiempo de inmovilidad realizado por los distintos grupos de animales en condiciones basales y durante las sesiones de entrenamiento, de asociación al tono y a un contexto visual. En condiciones basales y durante la sesión de entrenamiento no se encontraron diferencias significativas en el tiempo que los distintos grupos de ratones permanecieron inmóviles (tabla 8). Los ratones TS mostraron un menor tiempo de inmovilidad tanto en la sesión de condicionamiento del miedo a un tono ($p=0.02$; tabla 8, figura 28) como a un contexto visual ($p=0.03$; tabla 8, figura 28). El tratamiento con melatonina no ejerció ningún efecto sobre el tiempo de inmovilidad en ninguno de los dos genotipos durante la sesión de memoria de asociación tono-descarga (sesión 2; $p=0.95$, tabla 8, figura 28) o la sesión de memoria de asociación contexto visual-descarga (sesión 3; $p=0.89$, tabla 8, figura 28).

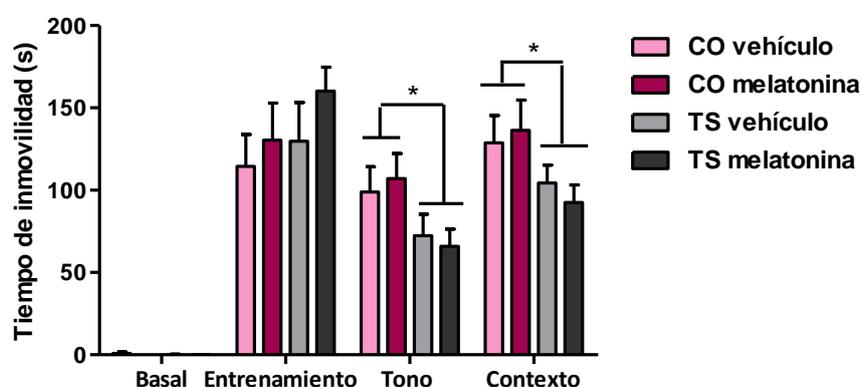


Figura 28. Medias \pm E.E.M. del porcentaje de tiempo de inmovilidad en condiciones basales, durante la sesión de entrenamiento (sesión 1), en la sesión de evaluación de la memoria de asociación tono-descarga (sesión 2) y en la sesión de evaluación de la memoria de asociación contexto visual-descarga (sesión 3) en la prueba de CFC realizada por los animales TS y CO tratados con melatonina o vehículo durante la etapa adulta. * $p<0.05$, TS vs. CO. Prueba de Bonferroni tras ANOVAs significativos (la tabla 8 muestra los resultados del análisis estadístico).

Tabla 8. Prueba de condicionamiento del miedo. Valores F y p del MANOVA (genotipo x tratamiento) de cada variable dependiente analizada en el CFC. Los valores estadísticamente significativos ($p<0.05$) se presentan en negrita.

	F _{1,50}		
	Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
Basal	0.24, $p=0.62$	0.97, $p=0.32$	0.72, $p=0.39$
Entrenamiento	1.18, $p=0.28$	1.26, $p=0.26$	0.12, $p=0.72$
Tono	5.72, $p=0.02$	0.004, $p=0.95$	0.26, $p=0.60$
Contexto	5.08, $p=0.03$	0.02, $p=0.89$	0.41, $p=0.52$

1.2.1.2. Laberinto acuático de Morris (MWM)

En esta prueba se valoró el efecto del tratamiento crónico durante la etapa adulta con melatonina o vehículo sobre el aprendizaje y la memoria espacial dependiente del hipocampo en los ratones TS y CO (figuras 29-33). El protocolo utilizado permite evaluar la memoria de trabajo (el aprendizaje a lo largo de los 8 ensayos de cada sesión) y la memoria de referencia (aprendizaje a lo largo de las 8 sesiones), así como el aprendizaje de procedimiento. La tabla 9 muestra los resultados del análisis estadístico de cada variable evaluada.

a) Sesiones de adquisición

➤ Velocidad

Como se muestra en la figura 29, no se encontraron diferencias significativas en las velocidades medias de natación durante las ocho sesiones de adquisición en los distintos grupos de animales tratados durante la edad adulta debidas al genotipo ($p=0.83$) o al tratamiento ($p=0.53$; tabla 9, figura 29).

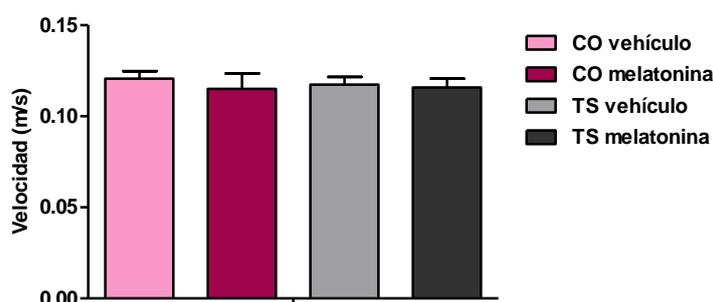


Figura 29. Medias \pm E.E.M. de la velocidad media de natación durante las ocho sesiones de adquisición de los ratones CO y TS tratados con melatonina o vehículo durante la etapa adulta (la tabla 9 muestra los resultados del análisis estadístico).

➤ Memoria de referencia

Como se observa en la figura 30A, todos los grupos de animales, independientemente del genotipo o del tratamiento, mejoraron su latencia de llegada a la plataforma a lo largo de las ocho sesiones de adquisición, lo que indica un aprendizaje de la posición de la plataforma ($p<0.001$).

Los ratones TS tuvieron más dificultades para alcanzar la plataforma que los ratones CO bajo el mismo tratamiento, tanto si éste era vehículo como si era melatonina ($p<0.001$; tabla 29; figuras 30B; 30C). El tratamiento con melatonina durante la etapa adulta mejoró la memoria de

Resultados

referencia de los animales ya que redujo de manera significativa la latencia de llegada a la plataforma tanto en los animales TS como en los CO ($p=0.005$; tabla 29, figuras 30D; 30E).

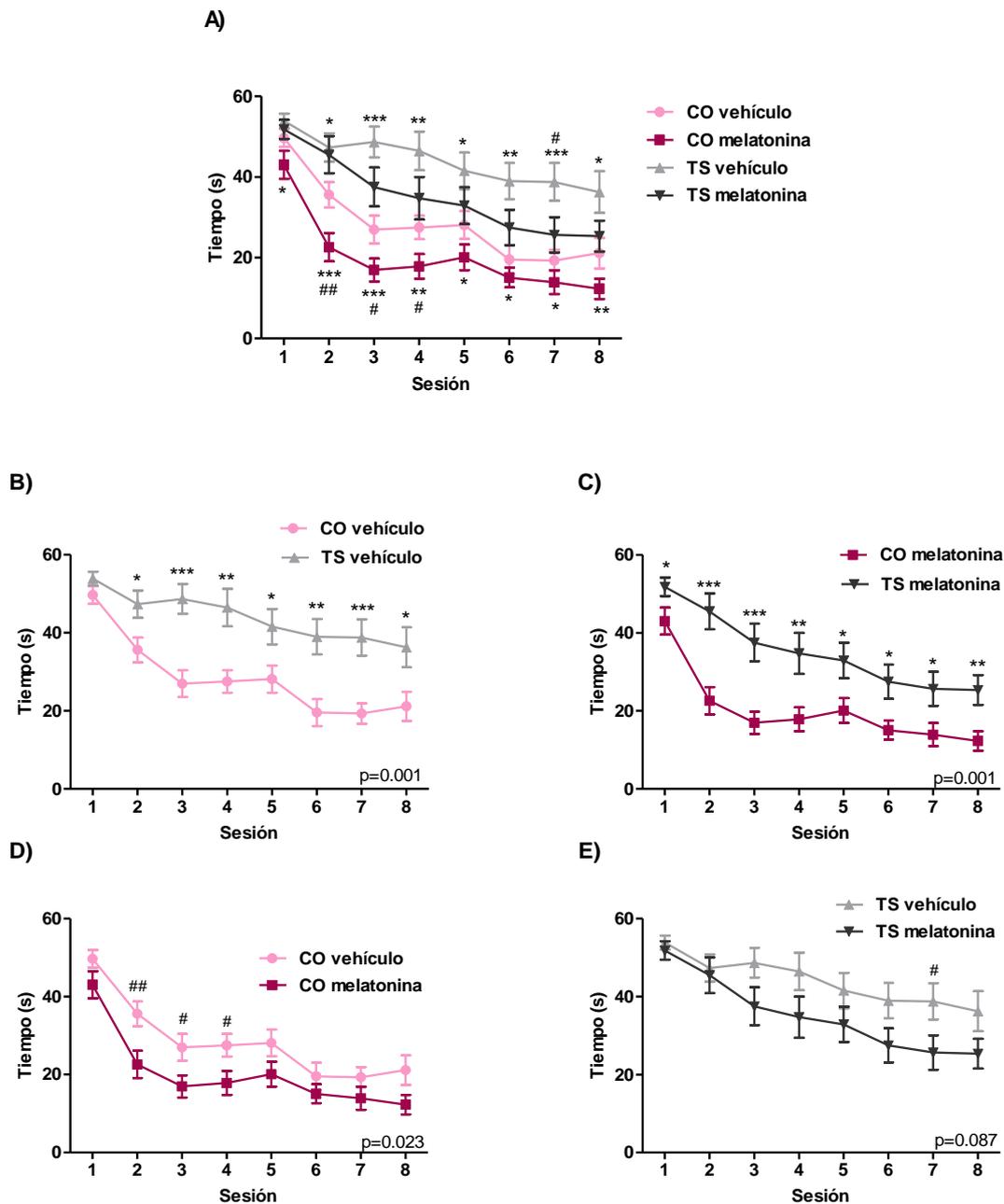


Figura 30. Medias \pm E.E.M. de la latencia de llegada a la plataforma durante las 8 sesiones de adquisición de los 4 grupos de animales (A), de los ratones TS y CO tratados con vehículo (B) y con melatonina (C) y de los ratones CO (D) y TS (E) bajo el mismo tratamiento. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, TS vs. CO; # $p<0.05$, ## $p<0.01$, melatonina vs. vehículo. Prueba de Bonferroni tras ANOVAs significativos. En la esquina inferior derecha de cada gráfica se muestra la significación (ANOVA) tras la comparación entre cada par de curvas (la tabla 9 muestra los resultados del análisis estadístico).

➤ *Memoria de trabajo*

Para evaluar la memoria de trabajo se analizó la ejecución de los diferentes grupos de ratones en cada ensayo a través de las sesiones (para cada ensayo 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 9, figura 31), es decir, en cada sesión todos los grupos aprendían la nueva posición de la plataforma. Sin embargo, los animales TS mostraron un deterioro de su memoria de trabajo en relación a los ratones CO ($p = 0.001$; tabla 9, figura 31). Después del tratamiento crónico con melatonina se observó una mejoría en la memoria de trabajo de los ratones CO respecto a los que recibieron vehículo ($p = 0.001$; tabla 9, figura 31). Además, la administración de esta indolamina también produjo una ligera mejoría en la memoria de trabajo de los animales TS, aunque ésta no alcanzó la significación estadística ($p = 0.1$; tabla 9, figura 31).

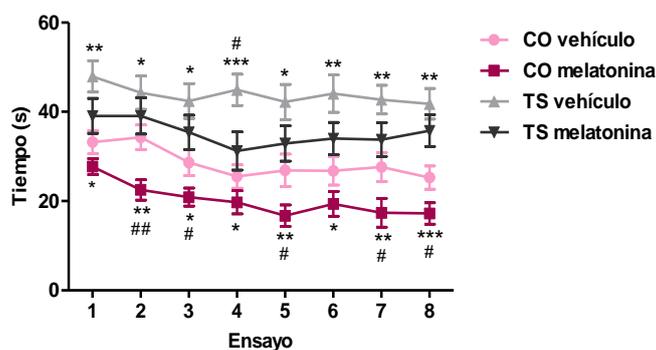


Figura 31. Media \pm E.E.M. de la latencia de llegada a la plataforma en cada uno de los 8 ensayos de las 8 sesiones de adquisición de los ratones TS y CO tratados con vehículo o con melatonina durante la etapa adulta. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, TS vs. CO; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, melatonina vs. vehículo. Prueba de Bonferroni tras ANOVAs significativos (la tabla 9 muestra los resultados del análisis estadístico).

➤ *Comportamiento tigmotáctico*

Como se muestra en la figura 32, los ratones TS mostraron un mayor comportamiento tigmotáctico ya que estuvieron más tiempo nadando por la periferia y menos por el centro del tanque que los animales controles bajo el mismo tratamiento ($p < 0.001$; tabla 9), por lo que estaban usando una estrategia inadecuada para localizar la plataforma. La melatonina administrada durante la etapa adulta mejoró el aprendizaje de procedimientos en los animales ya que redujo el tiempo de natación por la periferia del aparato tanto en los animales TS como en los CO ($p = 0.035$; tabla 9, figura 32A).

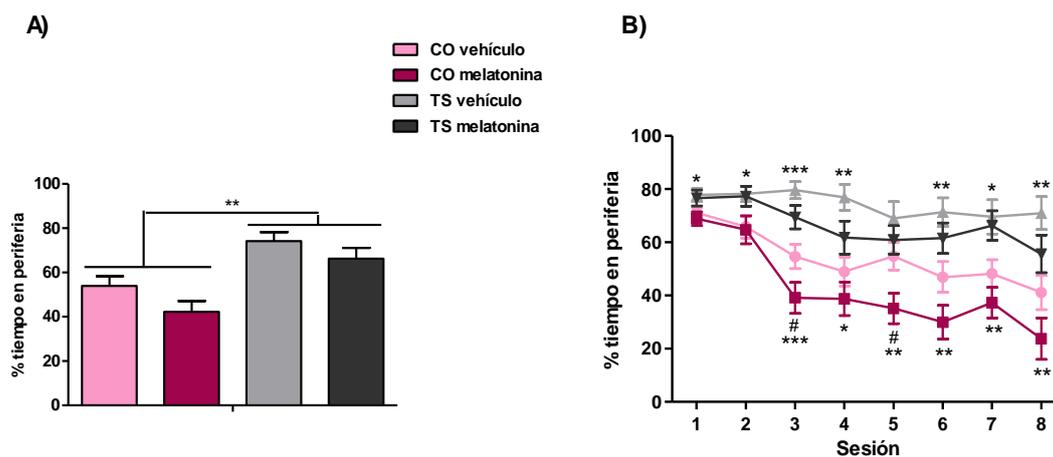


Figura 32. Medias \pm E.E.M. del porcentaje de tiempo nadando por la periferia que realizaron los ratones CO y TS tratados con melatonina o vehículo durante la etapa adulta en las ocho sesiones de adquisición **(A)** y a lo largo de cada una de las ocho sesiones de adquisición (S1-S8; **B**). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ TS vs. CO; # $p < 0.05$ melatonina vs. vehículo. Prueba de Bonferroni tras ANOVAs significativos (la tabla 9 muestra los resultados del análisis estadístico).

b) Sesiones de aprendizaje guiado

En la figura 33 se muestran las medias de las latencias de llegada a la plataforma de los ratones CO y TS tratados con melatonina o vehículo durante la etapa adulta. En las sesiones guiadas, en las que la plataforma era visible y estaba señalizada con una bandera, no se encontraron diferencias significativas en la latencia de llegada a la plataforma entre animales CO y TS ($p = 0.16$; tabla 9, figura 33). Sin embargo, el tratamiento con melatonina redujo el tiempo que los animales de ambos genotipos permanecieron nadando para localizar la plataforma ($p = 0.01$; tabla 9, figura 33).

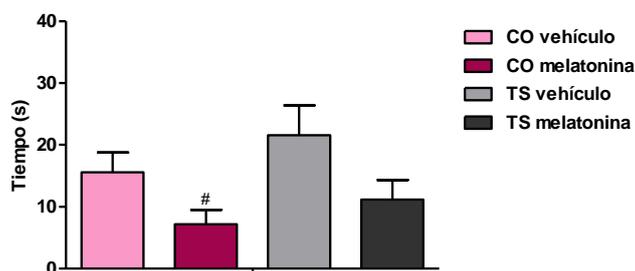


Figura 33. Medias \pm E.E.M. de la latencia para alcanzar la plataforma realizada por los ratones CO y TS tratados con melatonina o vehículo durante la etapa adulta en las sesiones de aprendizaje guiado (S9-12) en la prueba del laberinto acuático de Morris. # $p < 0.05$, melatonina vs. vehículo. Prueba de Bonferroni tras ANOVAs significativos (la tabla 9 muestra los resultados del análisis estadístico).

Tabla 9. 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	Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento	
Memoria de referencia (S1-S8)	MANOVA MR genotipo x tratamiento	F_{7,50}=11.90, p<0.001	F_{1,50}=26.55, p<0.001	F_{1,50}=8.43, p=0.005	F _{1,50} =0.009, p=0.92	
	Comparaciones <i>post hoc</i> entre cada par de curvas de aprendizaje	CO vehículo vs. TS vehículo		F_{1,27}=25.95, p=0.001		
		CO melatonina vs. TS melatonina		F_{1,20}=24.67, p=0.001		
		CO vehículo vs. CO melatonina			F_{1,26}=5.81, p=0.02	
		TS vehículo vs. TS melatonina			F _{1,21} =3.18, p=0.08	
Memoria de trabajo (E1-E8)	MANOVA MR genotipo x ensayo	F_{7,50}=7.85, p<0.001	F_{1,50}=26.56, p<0.001	F_{1,50}=8.31, p=0.006	F _{1,50} =0.003, p=0.96	
	Comparaciones <i>post hoc</i> entre cada par de curvas de aprendizaje	CO vehículo vs. TS vehículo		F_{1,27}=13.22, p=0.001		
		CO melatonina vs. TS melatonina		F_{1,20}=12.83, p=0.002		
		CO vehículo vs. CO melatonina			F_{1,26}=6.01, p=0.001	
		TS vehículo vs. TS melatonina			F _{1,21} =2.88, p=0.10	
Tigmtaxis (S1-S8)	MANOVA MR genotipo x tratamiento	F_{7,50}=11.61, p<0.001	F_{1,50}=24.09, p<0.001	F_{1,50}=4.71, p=0.035	F _{1,50} =0.19, p=0.66	
	Comparaciones <i>post hoc</i> entre cada par de curvas de aprendizaje	CO vehículo vs. TS vehículo		F_{1,27}=11.75, p=0.002		
		CO melatonina vs. TS melatonina		F_{1,20}=12.15, p=0.002		
		CO vehículo vs. CO melatonina			F _{1,26} =3.25, p=0.08	
		TS vehículo vs. TS melatonina			F _{1,21} =1.64, p=0.2	
Sesiones guiadas	Latencia		F _{1,50} =2.05, p=0.16	F_{1,50}=7.29, p=0.01	F _{1,50} =0.08, p=0.77	
	MANOVA genotipo x tratamiento		F _{1,50} =0.04, p=0.83	F _{1,50} =0.41, p=0.52	F _{1,50} =0.12, p=0.72	

1.2.2. Ansiedad y actividad general

1.2.2.1. Campo abierto

En la prueba del campo abierto se valoró la actividad locomotora y la ansiedad que mostraban los ratones TS o CO, después del tratamiento crónico con vehículo o con melatonina, frente a una situación estresante, como es una superficie abierta e iluminada. Los resultados estadísticos de esta prueba se muestran en la tabla 10.

Resultados

Como muestra la figura 34A, los ratones TS, tanto los tratados con melatonina como con vehículo, se mostraron hiperactivos en comparación a los CO, ya que recorrieron mayor distancia en la periferia del aparato ($p=0.004$; tabla 10) y tuvieron una mayor actividad horizontal durante toda la prueba ($p=0.008$; tabla 10). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ratones TS y CO en distancia recorrida en el centro del aparato, lo que indica un nivel de ansiedad similar en ambos genotipos ($p=0.23$; tabla 10, figura 34A). El tratamiento con melatonina no modificó la actividad vertical (número de alzamientos) ($p=0.15$; tabla 10, figura 34B) u horizontal (distancia recorrida) ($p=0.96$; tabla 10, figura 34A) en ninguno de los dos genotipos.

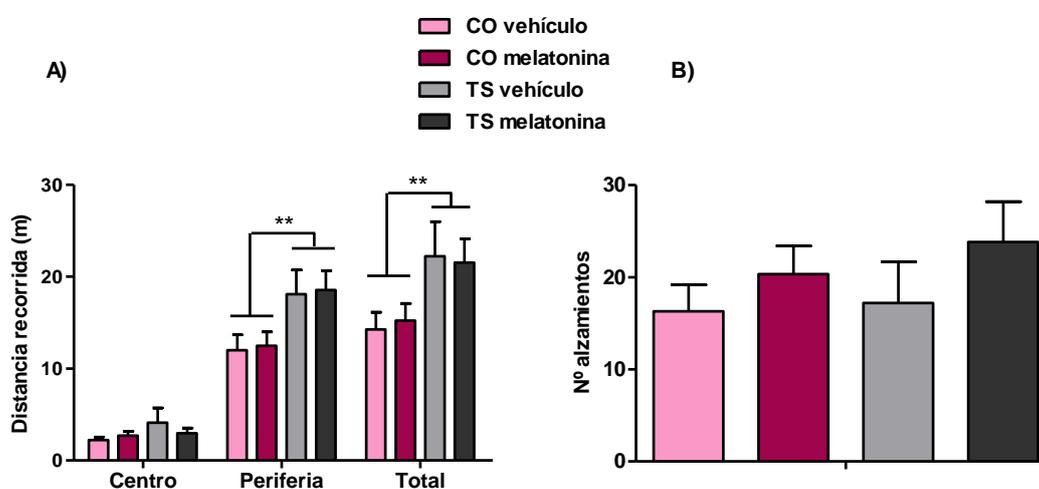


Figura 34. Medias \pm E.E.M. de la distancia recorrida (A) y del número de alzamientos (B) realizados por los ratones TS y CO después del tratamiento crónico con melatonina o vehículo durante la etapa adulta en la prueba del campo abierto. ** $p < 0.01$ TS vs. CO. Prueba de Bonferroni tras ANOVAs significativos (la tabla 10 muestra los resultados del análisis estadístico).

1.2.2.2. Laberinto elevado en cruz

En la prueba del laberinto elevado en cruz se valoró la actividad de los ratones TS y CO en un ambiente novedoso que presenta dos zonas diferentes: una potencialmente aversiva (brazos abiertos) y otra segura (brazos cerrados). El análisis estadístico de los resultados obtenidos en esta prueba se muestra en la tabla 10.

Como se observa en la figura 35A, al igual que en la prueba anterior, los ratones TS volvieron a mostrar una mayor hiperactividad, ya que realizaron un mayor número de entradas en los brazos abiertos que los animales CO ($p=0.006$; tabla 10). El tratamiento con melatonina no revirtió este comportamiento anormal en este grupo de animales ($p=0.12$; tabla 10, figura 35A).

Cuando se evaluaron los componentes cognitivos de la ansiedad no se encontraron diferencias debidas al genotipo en el número de conductas de evaluación del riesgo, ya que el número de conductas de aproximación-retirada (SAP) y de veces que asomaban la cabeza por los brazos abiertos (HD) fueron similares tanto en ratones TS como en CO ($p=0.13$; tabla 10, figura 35C). Además, tampoco se encontraron diferencias entre animales TS y CO cuando se analizaron los componentes motores de la ansiedad, como indica el porcentaje de tiempo que pasaron en los brazos abiertos ($p=0.09$; tabla 10, figura 35B) o el tiempo que los animales permanecieron inmóviles al inicio de la prueba ($p=0.42$; tabla 10, figura 35D). Aunque la melatonina no produjo ningún efecto sobre los componentes cognitivos de la ansiedad en los animales TS o CO ($p=0.89$; tabla 10, figura 35C), sí que alteró los componentes motores de la ansiedad ya que los animales TS que habían recibido este tratamiento pasaron mayor tiempo en los brazos abiertos del aparato ($p=0.05$; tabla 10, figura 35B).

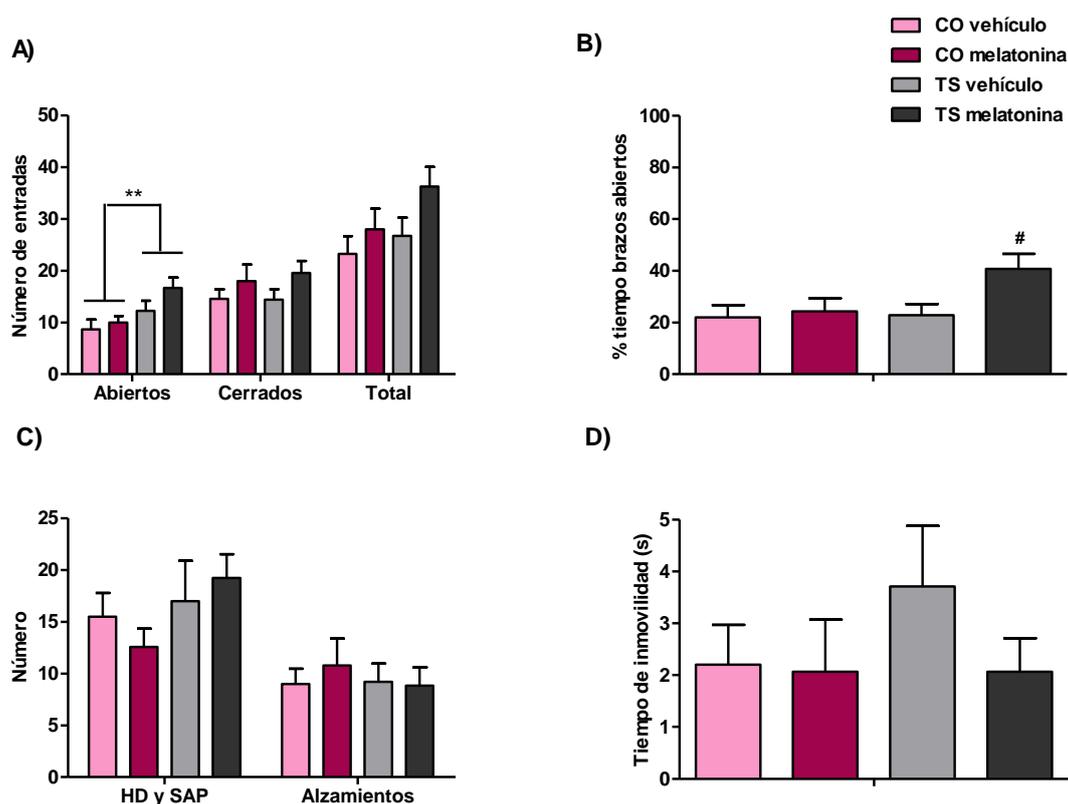


Figura 35. Medias \pm E.E.M. del número de entradas a brazos abiertos, cerrados y del número total de entradas (A), del porcentaje de tiempo que permanecieron en los brazos abiertos (B), del número de conductas de evaluación de riesgo (HD + SAPs) y de alzamientos (C) y del tiempo de inmovilidad inicial (D) realizados por los animales TS y CO tratados con melatonina o con vehículo durante la etapa adulta. ** $p < 0.01$ TS vs. CO; # $p < 0.05$ melatonina vs. vehículo. Prueba de Bonferroni tras ANOVAs significativos (la tabla 10 muestra los resultados del análisis estadístico).

Resultados

Tabla 10. Campo abierto y laberinto elevado en cruz. Valores F y p del MANOVA (genotipo x tratamiento) de cada variable dependiente analizada. Los valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$) se presentan en negrita.

<i>Campo abierto</i>	F_{1,50}		
	Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
Distancia recorrida: periferia	9.14, p=0.004	0.14, p=0.71	0.00, p=0.99
Distancia recorrida: centro	1.48, p=0.23	0.05, p=0.82	0.84, p=0.36
Distancia recorrida: total	7.52, p=0.008	0.002, p=0.96	0.09, p=0.75
Alzamientos	0.35, p=0.55	2.06, p=0.15	0.12, p=0.73
<i>Laberinto elevado en cruz</i>			
Número de entradas en los brazos abiertos	8.10, p=0.006	2.50, p=0.12	0.73, p=0.39
Número de entradas en los brazos cerrados	0.09, p=0.75	3.23, p=0.08	0.13, p=0.71
Número total de entradas	2.52, p=0.11	3.74, p=0.06	0.42, p=0.51
Tiempo de inmovilidad inicial	0.66, p=0.42	0.90, p=0.34	0.65, p=0.42
Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos	2.98, p=0.09	4.01, p=0.05	2.42, p=0.12
Número de conductas de evaluación del riesgo	2.28, p=0.13	0.017, p=0.89	0.91, p=0.34

1.2.3. Actividad exploratoria y atención: Tabla de agujeros

En la prueba de la tabla de agujeros se evaluó la actividad general (número de desplazamientos y de alzamientos), la actividad exploratoria (número de veces que los ratones exploraban los agujeros y el tiempo que pasaban explorándolos) y la atención (número de repeticiones en agujeros previamente explorados) de los ratones CO y TS tratados con melatonina o vehículo durante la etapa adulta.

La tabla 11 muestra las puntuaciones obtenidas por los cuatro grupos experimentales durante la prueba de la tabla de agujeros. Tanto los ratones TS tratados con vehículo como con melatonina mostraron mayor actividad que sus respectivos CO ya que recorrieron mayor distancia ($p=0.001$; tabla 11) y realizaron un mayor número de exploraciones en el aparato ($p=0.001$; tabla 11). El tratamiento con melatonina aumentó significativamente la actividad exploratoria (número de exploraciones) en ambos genotipos ($p=0.001$; tabla 11). Por otro lado,

a pesar de que los ratones TS a los que se les había administrado melatonina parecen tener una menor atención, ya que estos animales realizaron más repeticiones en agujeros que habían sido previamente explorados (índice ABA) que los animales de los otros grupos experimentales ($p=0.025$; tabla 11), este resultado parece deberse al incremento de exploraciones totales encontrado en este grupo. Cuando se corrige el índice ABA dividiéndolo por el número de exploraciones (ABA/número de exploraciones) las diferencias entre los ratones TS tratados con melatonina y el resto de grupos desaparecen ($p=0.18$; tabla 11).

Tabla 11. Tabla de agujeros. Medias \pm E.E.M. de las puntuaciones obtenidas por los diferentes grupos experimentales tras el tratamiento con melatonina o vehículo durante la etapa adulta. Valores F y p del MANOVA (genotipo x tratamiento) de cada variable dependiente analizada. Los valores estadísticamente significativos ($p<0.05$) se presentan en negrita.

	Vehículo		Melatonina		F _{1,50}		
	TS	CO	TS	CO	Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
Distancia (m)	17.1 \pm 2.51	9.39 \pm 1.06	13.18 \pm 0.99	10.23 \pm 1.15	11.83, p=0.001	1.01, p=0.31	2.28, p=0.12
Número de Alzamientos	17.5 \pm 5.01	12.87 \pm 1.91	20.67 \pm 5.69	13.00 \pm 2.53	0.13, p=0.71	1.13, p=0.29	1.22, p=0.27
Número de exploraciones	19.2 \pm 3.11	14.37 \pm 1.54	33.38 \pm 2.28	20.42 \pm 3.13	12.05, p=0.001	15.56, p=0.001	2.50, p=0.11
Tiempo de exploración (s)	8.72 \pm 2.71	7.61 \pm 2.49	14.05 \pm 3.29	13.00 \pm 3.37	0.19, p=0.66	3.55, p=0.06	0.004, p=0.94
Índice ABA	3.57 \pm 0.70	2.68 \pm 0.57	8.92 \pm 1.27	5.14 \pm 1.36	5.35, p=0.025	14.98, p=0.001	2.06, p=0.15
ABA/nº exploraciones	0.24* \pm 0.02	0.17 \pm 0.02	0.21 \pm 0.02	0.15 \pm 0.03	1.82, p=0.18	2.81, p=0.08	0.62, p=0.43

1.2.4. Habilidades sensorimotoras

1.2.4.1. Batería de pruebas sensorimotoras

La tabla 12 muestra las puntuaciones obtenidas por los distintos grupos de animales en las diferentes pruebas sensoriales y motoras. No se encontraron diferencias debidas al genotipo en la visión, en la respuesta de sobresalto, en la fuerza de agarre, en el reflejo prensil, en el equilibrio sobre la barra de madera o en la coordinación motora durante la prueba de la percha. Sin embargo, los ratones TS adultos mostraron peor equilibrio en la barra de aluminio y una capacidad de tracción limitada comparada con los animales CO. Por su parte, el tratamiento crónico con melatonina durante la edad adulta no modificó ninguna habilidad sensorial o motora en ninguno de los dos genotipos.

Tabla 12. Pruebas sensorimotoras. Medias \pm E.E.M. de las puntuaciones obtenidas por los ratones TS y CO después del tratamiento crónico con melatonina o vehículo durante la edad adulta. Valores F y p del MANOVA (genotipo x tratamiento) de cada variable dependiente analizada. Los valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$) se presentan en negrita.

	Vehículo		Melatonina		F _{1,50}			
	CO	TS	CO	TS	Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento	
Visión	2.12 ± 0.17	2.25 ± 0.13	2.00 ± 0.20	2.15 ± 0.10	1.86 p=0.18	0.66, p=0.41	0.17, p=0.68	
Respuesta sobresalto	1.00 ± 0.00	1.35 ± 0.13	1.21 ± 0.15	1.23 ± 0.16	2.13, p=0.15	0.11, p=0.73	1.77, p=0.18	
Sensibilidad táctil	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.07	0.14 ± 0.09	0.07 ± 0.07	0.002, p=0.96	1.12, p=0.29	0.96, p=0.33	
Reflejo de enderezamiento	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00				
Fuerza agarre	2.12 ± 0.12	2.00 ± 0.14	1.78 ± 0.21	2.23 ± 0.20	1.20, p=0.27	0.21, p=0.88	2.20, p=0.14	
Equilibrio	Madera	2.26 ± 0.15	2.42 ± 0.29	2.42 ± 0.30	2.30 ± 0.20	0.07 p=0.93	0.00, p=0.93	0.32, p=0.57
	Aluminio	1.13 ± 0.41	0.42 ± 0.25	1.57 ± 0.52	0.38 ± 0.21	6.26, p=0.015	0.27, p=0.6	0.40, p=0.52
Latencia madera	20.0 ± 0.00	19.2 ± 0.63	18.9 ± 1.03	18.5 ± 1.46	0.41, p=0.52	0.91, p=0.34	0.03, p=0.85	
Latencia aluminio	10.9 ± 1.77	6.78 ± 1.02	10.7 ± 1.75	8.38 ± 1.87	3.93, p=0.053	0.2, p=0.65	0.27, p=0.6	
Reflejo prensil	2.37 ± 0.22	2.00 ± 0.3	2.00 ± 0.23	1.61 ± 0.36	1.54, p=0.21	1.54, p=0.21	0.008, p=0.93	
Capacidad de tracción	0.87 ± 0.38	2.42 ± 0.75	0.78 ± 0.52	1.92 ± 0.70	4.86 p=0.032	0.29, p=0.59	0.88, p=0.76	
Prueba percha	Latencia caída	15.5 ± 5.56	14.2 ± 5.06	17.6 ± 5.11	11.4 ± 4.05	0.59, p=0.44	3.75, p=0.06	0.16, p=0.68
	Movimientos	1.06 ± 0.39	1.42 ± 0.44	1.57 ± 0.89	1.69 ± 0.34	2.15, p=0.17	2.40, p=0.12	0.97, p=0.36
	Latencia llegada	54.4 ± 3.43	50.8 ± 4.91	49.7 ± 6.53	56.3 ± 3.61	1.56, p=0.23	3.75, p=0.06	2.25, p=0.18

1.2.4.2. Actividad espontánea: Actimetría

En la figura se muestra la actividad espontánea de los animales TS y CO tratados con melatonina o vehículo en su jaula habitual durante un ciclo completo de 24 horas (12 h de luz y 12 h de oscuridad) (figura 36A). En esta prueba, todos los ratones, independientemente de su genotipo o tratamiento, mostraron un ritmo diario normal de actividad locomotora espontánea. Puesto que son animales nocturnos, su actividad fue mayor durante el periodo de oscuridad (08:00-20.00 h) que durante el de luz (20:00-08:00 h). Como se muestra en la figura 36B, no se encontró ningún efecto significativo en actividad espontánea debido al genotipo, (fase oscura:

$F_{1,50}=0.37$, $p=0.54$; fase luminosa: $F_{1,50}=0.24$, $p=0.62$), al tratamiento (fase oscura: $F_{1,50}=0.13$, $p=0.72$; fase luminosa: $F_{1,50}=1.28$, $p=0.26$), o a la interacción de ambas variables (fase oscura: $F_{1,50}=0.33$, $p=0.56$; fase luminosa: $F_{1,50}=0.005$, $p=0.94$).

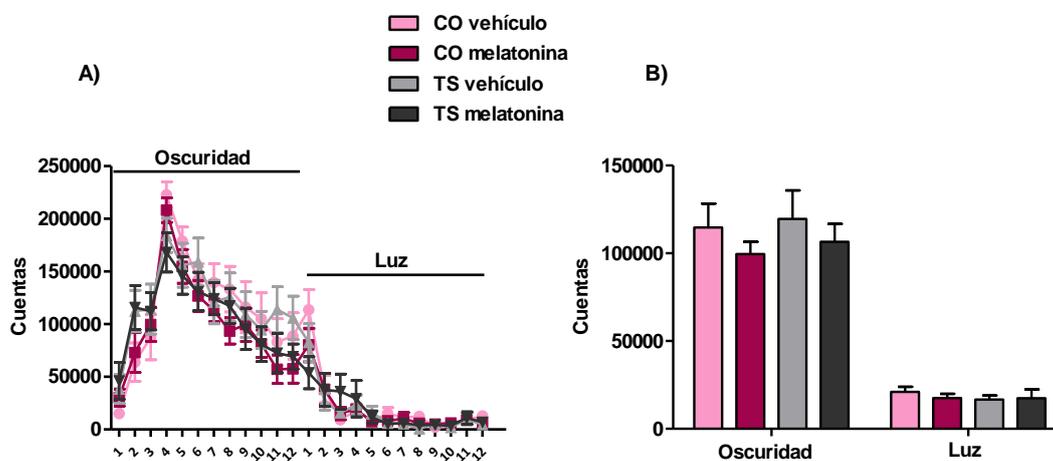


Figura 36. Medias \pm E.E.M del número total de cuentas realizadas por los ratones CO y TS tratados con melatonina o vehículo durante la etapa adulta a lo largo de un ciclo completo de 24 horas (A) y del número medio de cuentas realizadas por cada grupo en los periodos de luz y oscuridad (B) durante la prueba de la actimetría.

1.2.4.3. Coordinación motora: Rotarod

La figura 37 muestra la latencia de caída a diferentes velocidades constantes y durante el ciclo de aceleración de los animales TS y CO tratados con melatonina o vehículo durante la prueba del rotarod. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los cuatro grupos de ratones tratados durante la edad adulta en la latencia de caída en el rotarod a distintas velocidades constantes, especialmente en las condiciones experimentales que requerían más dificultad, 20 (ANOVA 'genotipo': $F_{1,50}=1.96$, $p=0.16$, 'tratamiento': $F_{1,50}=0.02$, $p=0.89$, 'genotipo x tratamiento': $F_{1,50}=1.18$, $p=0.28$) y 40 r.p.m. (ANOVA 'genotipo': $F_{1,50}=0.31$, $p=0.58$, 'tratamiento': $F_{1,50}=0.00$, $p=0.99$, 'genotipo x tratamiento': $F_{1,50}=0.04$, $p=0.82$). Asimismo, durante el ciclo de aceleración, en el que el nivel de exigencia de la prueba fue aumentando progresivamente, la latencia de caída a velocidades crecientes fue similar en los cuatro grupos experimentales (ANOVA 'genotipo': $F_{1,50}=0.39$, $p=0.53$, 'tratamiento': $F_{1,50}=0.28$, $p=0.71$, 'genotipo x tratamiento': $F_{1,50}=0.05$, $p=0.88$).

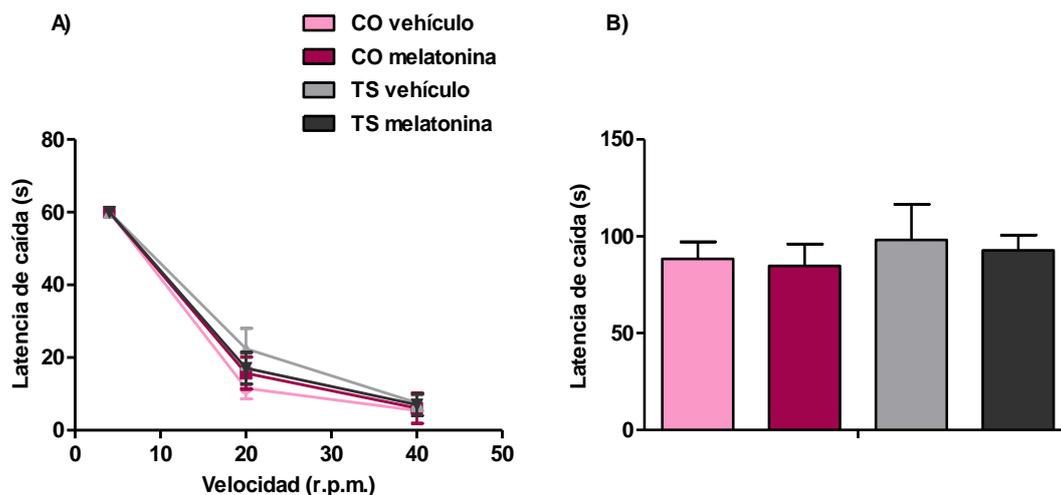


Figura 37. Medias \pm E.E.M. de la latencia de caída a distintas velocidades constantes **(A)** y de la latencia de caída durante el ciclo de aceleración **(B)** realizadas por los ratones CO y TS tratados con melatonina o vehículo durante la etapa adulta en la prueba del rotarod.

1.3. Efectos de la melatonina sobre las alteraciones neuromorfológicas: neurogénesis hipocampal

1.3.1. Efectos sobre la densidad de neuronas granulares maduras en el DG

Para evaluar los efectos de la melatonina sobre la hipocelularidad que presentan los animales TS en el hipocampo se estudió la densidad de neuronas granulares maduras en el DG del hipocampo (figura 38A). Como se muestra en la figura 38B, la densidad de células DAPI⁺ en el DG de los ratones TS tratados era significativamente menor que los animales CO ($p=0.03$, tabla 13). El tratamiento crónico con melatonina aumentó la densidad de células DAPI⁺ en ambos genotipos ($p=0.003$, tabla 13, figura 38B); especialmente en los TS. Aunque en el grupo CO la melatonina también aumentó ligeramente la densidad de células granulares, este efecto no alcanzó la significación estadística ($p=0.07$; figura 38B). Sin embargo, tras el tratamiento con la indolamina, la densidad de neuronas granulares maduras en el DG de los ratones TS se normalizó totalmente, ya que no difería de la densidad observada en el grupo de animales CO tratados con vehículo ($p=0.25$, tabla 13, figura 38B).

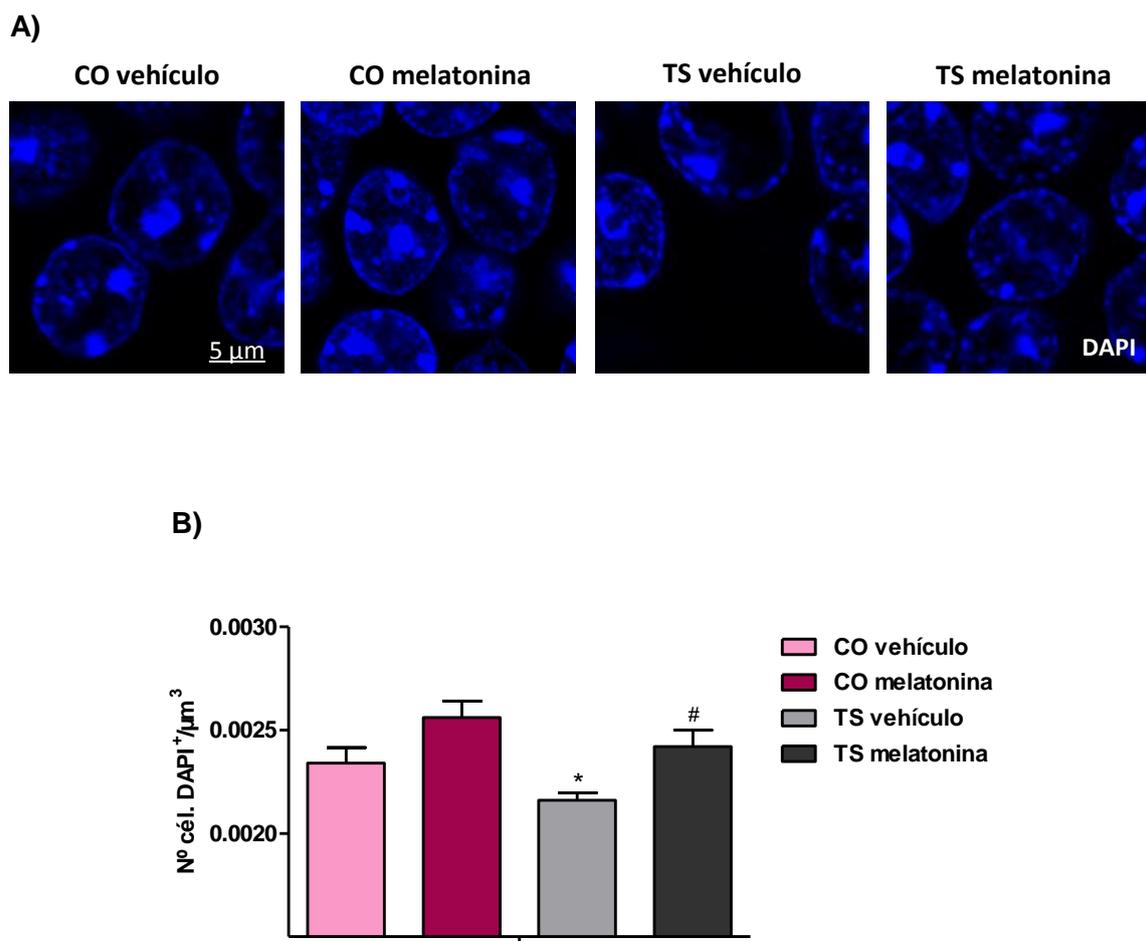


Figura 38. Células DAPI⁺. **A)** Imágenes representativas tomadas con el microscopio confocal de la inmunotinción con DAPI (marcador de núcleos celulares) en la GCL del DG hipocámpal de animales TS y CO tratados con vehículo o melatonina durante la etapa adulta. **B)** Medias \pm E.E.M. de la densidad de neuronas granulares maduras (células DAPI⁺) en el DG de los ratones pertenecientes a los 4 grupos experimentales. * $p < 0.05$ TS vs. CO; # $p < 0.05$ melatonina vs. vehículo. Prueba de Bonferroni tras ANOVAs significativos (la tabla 13 muestra los resultados del análisis estadístico).

1.3.2. Efectos sobre la proliferación celular (Ki67) y sobre la diferenciación neuronal (DCX y CLR) en la SGZ del hipocampo

Puesto que la melatonina mejoró la hipocelularidad de neuronas granulares maduras en los animales TS, se estudiaron los efectos de esta indolamina sobre la proliferación celular en la SGZ del hipocampo mediante una inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-Ki67 para marcar células en división (figura 39A). Como se muestra en la figura 39B, los animales TS presentaron menor densidad de células Ki67⁺ en la SGZ en comparación con los ratones CO ($p < 0.001$, tabla 13). El tratamiento crónico con melatonina aumentó significativamente la densidad de células Ki67⁺ en ratones TS ($p = 0.01$; tabla 13), pero no modificó la densidad de esta población celular en el grupo de animales CO (figura 39B, tabla 13).

Resultados

Para evaluar los efectos de la melatonina sobre la diferenciación y maduración neuronal se realizó una doble inmunohistoquímica con marcadores para diferentes subpoblaciones de neuronas inmaduras: utilizamos la doblecortina (DCX) que marca neuroblastos en diferenciación y la calretinina (CLR) que marca células que aún se encuentran en el proceso de diferenciación neuronal, pero en una fase más tardía (figura 39A).

Los animales TS tratados con vehículo mostraron una densidad reducida de células DCX⁺/CLR⁻ en comparación con el grupo CO ($p=0.003$; figura 39C). La administración crónica de melatonina normalizó totalmente la densidad de este tipo de células en los ratones TS ($p=0.01$; figura 39C), ya que estos animales mostraron una densidad similar de células DCX⁺/CLR⁻ que los animales CO tratados con vehículo ($p=0.58$; figura 39C).

La densidad de células CLR⁺ (incluyendo células DCX⁺/CLR⁺ y DCX⁻/CLR⁺) también fue menor en los ratones TS que en los animales CO ($p=0.018$; tabla 13, figura 39C). Después de la administración crónica de melatonina, la densidad de esta población celular también incrementó enormemente y no difirió significativamente de la densidad encontrada en el grupo CO tratado con vehículo ($p=0.48$; figura 39C).

Sin embargo, el tratamiento crónico con melatonina no modificó significativamente la densidad de células DCX⁺ (CO melatonina vs. CO vehículo: $t=1.22$, $p=0.25$) o CLR⁺ (CO melatonina vs. CO vehículo: $t=0.67$; $p=0.51$) con respecto al grupo control (figura 39C).

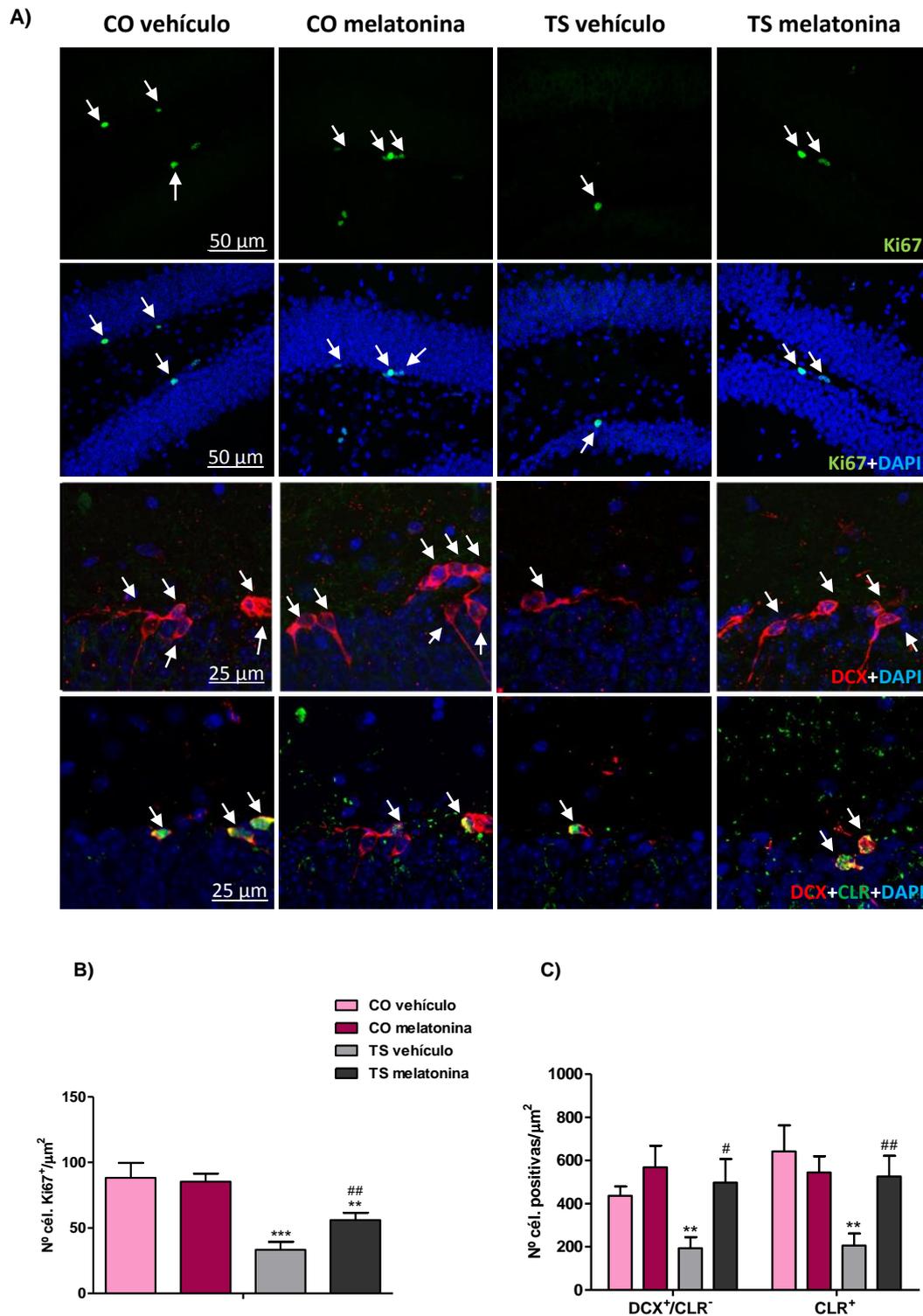


Figura 39. Imágenes representativas obtenidas con un microscopio de fluorescencia de células Ki67⁺ (fila superior), de la coinmunotinción con DAPI y Ki67 (segunda fila) y de neuronas inmaduras expresando células DCX⁺ (tercera fila) y CLR⁺ (fila inferior) en el DG de los ratones TS y CO tratados con melatonina o vehículo durante la etapa adulta (**A**). Medias ± E.E.M. de la densidad media de células proliferativas (**B**) y de neuroblastos en diferentes estadios de diferenciación marcados con DCX o con CLR (**C**) en la SGZ del hipocampo en los ratones TS y CO tratados con vehículo o melatonina durante la etapa adulta. **p<0.01, ***p<0.001 TS vs. CO; #p<0.05, ##p<0.01 melatonina vs. vehículo. Prueba de Bonferroni tras ANOVAs significativos (la tabla 13 muestra los resultados del análisis estadístico).

Resultados

Tabla 13. Valores F y p del MANOVA (genotipo x tratamiento) de las densidades de diferentes marcadores celulares analizados en el DG de los ratones TS y CO tratados con melatonina o vehículo durante la etapa adulta. Los valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$) se presentan en negrita.

	F _{1,29}		
	Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
Número cél. DAPI ⁺ /μm ³	4.99, p<0.05	11.00, p<0.01	0.05, p=0.82
Número cél. Ki67 ⁺ /μm ²	27.73, p<0.001	1.52, p=0.22	1.16, p=0.29
Número cél. DCX ⁺ /μm ²	3.89, p=0.059	7.61, p<0.01	1.52, p=0.22
Número cél. CLR ⁺ /μm ²	6.30, p<0.05	1.51, p=0.22	5.29, p<0.05

1.4. Efectos de la melatonina sobre las alteraciones en la conectividad y plasticidad sináptica del hipocampo

1.4.1. Efectos sobre la densidad de botones sinápticos GABAérgicos (GAD65⁺) y glutamatérgicos (VGLUT1⁺) en la ML del DG: balance inhibición/excitación

Para evaluar los efectos del tratamiento crónico con melatonina sobre el desequilibrio entre sinapsis excitadoras e inhibitorias existente en el cerebro del ratón TS, se realizó una doble inmunohistoquímica en la que se usaron dos marcadores, VGLUT1 para medir botones sinápticos excitadores y GAD65 para medir botones sinápticos inhibitorios, en la ML del DG del hipocampo. A la vista de los resultados (tabla 14; figura 40), los ratones TS tratados con vehículo presentaron una menor área ocupada por botones VGLUT1⁺ ($p < 0.001$; tabla 14, figura 40A) y una mayor área ocupada por botones GAD65⁺ ($p < 0.001$; tabla 14, figura 40A) que los animales CO bajo el mismo tratamiento. La administración crónica de melatonina no produjo ningún efecto sobre la densidad de botones GABAérgicos en ninguno de los dos genotipos ($p = 0.99$; tabla 14, figura 40C). Sin embargo, en los animales TS, el tratamiento con melatonina aumentó la densidad de botones VGLUT1⁺ ($p < 0.001$; figura 40B), reduciendo, por lo tanto, el exceso de inhibición que en condiciones normales presentan estos ratones. El tratamiento con melatonina no tuvo ningún efecto sobre la densidad de botones del marcador sináptico glutamatérgico en los animales CO.

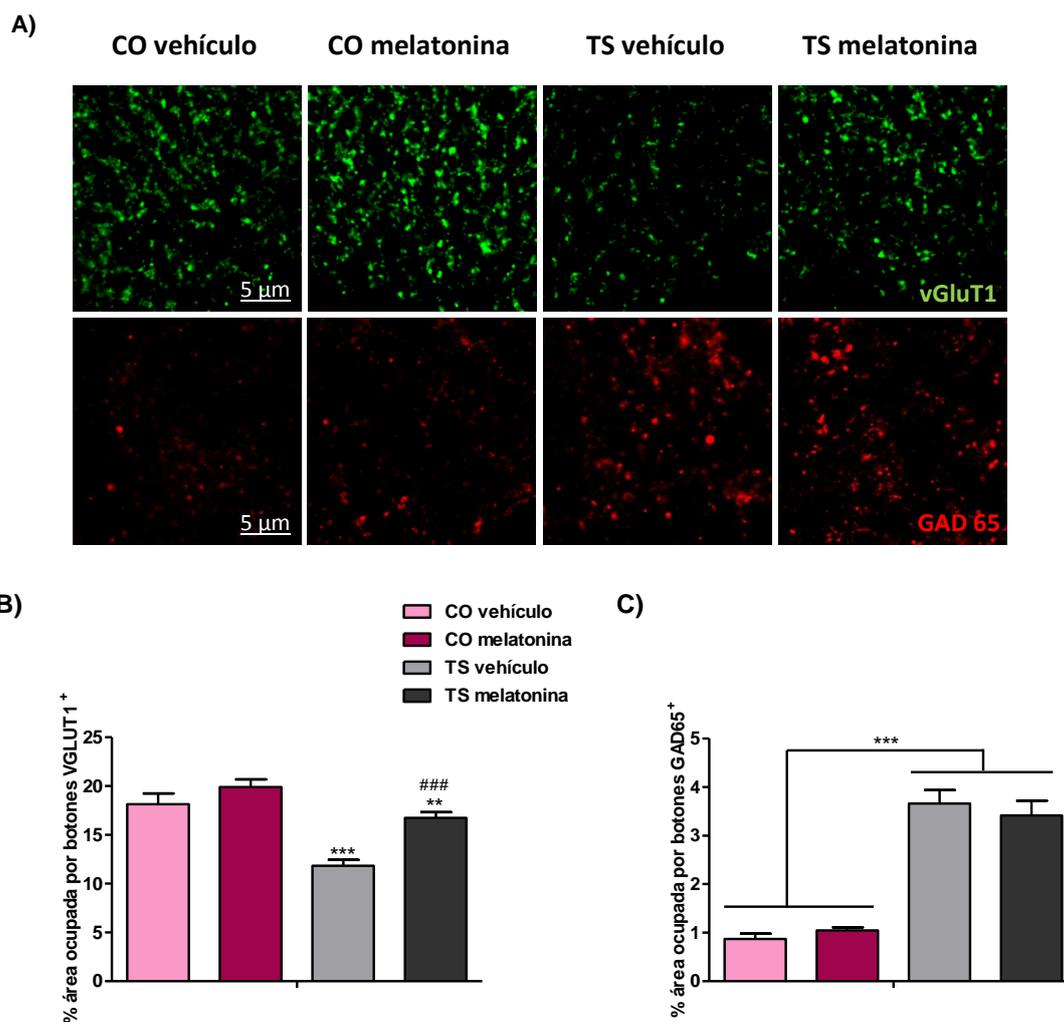


Figura 40. Botones VGLUT1⁺ y GAD65⁺. (A) Imágenes representativas obtenidas con microscopía confocal de los botones inmunopositivos para VGLUT1 (verde, botones sinápticos glutamatergicos) y GAD65 (rojo, botones sinápticos GABAérgicos) en la ML del DG. Medias \pm E.E.M. del porcentaje de la superficie total ocupada por botones VGLUT1⁺ (B) y GAD65⁺ (C) en los animales TS y CO tratados con melatonina o vehículo durante la etapa adulta. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ TS vs. CO; ### $p < 0.001$ vehículo vs. melatonina. Prueba de Bonferroni tras ANOVAs significativos (la tabla 14 muestra los resultados del análisis estadístico).

Tabla 14. Valores F y p del MANOVA (genotipo x tratamiento) de cada variable dependiente analizada. Los valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$) se presentan en negrita.

	F _{1,29}		
	Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
Porcentaje de área ocupada por botones GAD65 ⁺	137.95, p<0.001	0.04, p=0.99	1.02, p=0.32
Porcentaje de área ocupada por botones VGLUT1 ⁺	28.49, p<0.001	13.57, p<0.001	4.46, p<0.05

1.4.2. Efectos sobre la plasticidad sináptica neuronal del hipocampo: potenciación a largo plazo (LTP)

Para valorar el efecto del tratamiento crónico con melatonina sobre la plasticidad y la eficacia de la transmisión sináptica hipocampal, se llevaron a cabo registros de la actividad eléctrica en rodajas de hipocampo de los ratones CO y TS tratados crónicamente con vehículo o melatonina. La potenciación a largo plazo fue inducida por TBS en la vía colateral de Schaffer.

El análisis de los registros eléctricos tomados en condiciones basales, es decir, antes de aplicar el TBS, no mostró diferencias significativas en las amplitudes entre los cuatro grupos experimentales (figura 41A). Sin embargo, el análisis de los potenciales postsinápticos excitatorios (fEPSPs) tras aplicar el TBS, reveló déficits en la inducción de la LTP en el área CA1 en el grupo de animales TS tratados con vehículo con respecto a los CO bajo el mismo tratamiento ($p < 0.01$; tabla 15, figura 41B). La administración crónica de melatonina aumentó la LTP de manera significativa en el grupo de animales TS ($p < 0.001$; tabla 15, figura 41B), sin embargo, no produjo ningún efecto en los ratones CO ($p = 0.62$; tabla 15, figura 41B). Estos hallazgos indican que el tratamiento crónico con melatonina rescató completamente la LTP en ratones TS, ya que, al comparar las medias de las pendientes de los fEPSPs no se encontraron diferencias entre los grupos de ratones TS que habían recibido melatonina y los CO que habían sido tratados con vehículo ($p = 0.66$; tabla 15, figura 41B).

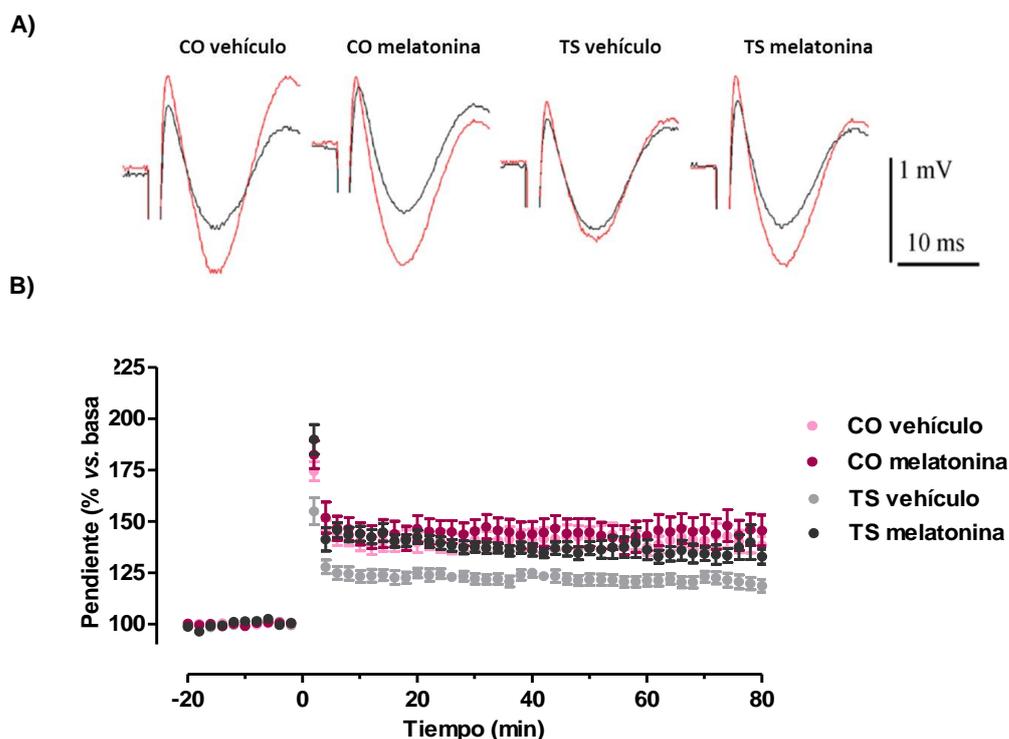


Figura 41. (A) Imágenes representativas de los fEPSPs antes de aplicar el estímulo (ondas basales, negro) y después de aplicar la *theta burst stimulation* (TBS, rojo). La barra representa una escala de 1mV y 10ms. **(B)** Medias \pm E.E.M. de las pendientes de los fEPSPs expresadas como porcentaje de cambio respecto a los valores de referencia registrados durante el establecimiento de la línea basal de los animales TS y CO tratados con vehículo o melatonina durante la etapa adulta. La tabla 15 muestra los resultados del análisis estadístico.

Tabla 15. Valores F y p del MANOVA RM y análisis *post hoc* de las curvas de la LTP. Los valores estadísticamente significativos se presentan en negrita.

	$F_{1,35}$		
	Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
Basal	0.19, p=0.65	0.01, p=0.91	0.19, p=0.65
Después de la TBS	7.85, p<0.01	4.86, p<0.05	1.80, p=0.18
Comparaciones <i>post hoc</i> entre grupos:			
<i>CO vehículo vs. TS vehículo</i>	11.09, p<0.01		
<i>TS vehículo vs. TS melatonina</i>		15.1, p<0.001	
<i>CO vehículo vs. CO melatonina</i>		0.25, p=0.62	
<i>CO vehículo vs. TS melatonina</i>			0.19, p=0.66

1.5. Efectos de la melatonina sobre distintos procesos implicados en la neurodegeneración cerebral

1.5.1. Efectos sobre la degeneración del sistema colinérgico del septo medial del prosencéfalo basal

Para cuantificar el número de neuronas colinérgicas en el septo medial se realizó un análisis inmunohistoquímico en el que se utilizó un anticuerpo que se une al enzima acetilcolina transferasa (ChAT) y que se encuentra en las neuronas colinérgicas productoras de acetilcolina (figura 42A). Los ratones TS tratados con vehículo mostraron un número significativamente menor de células ChAT⁺ que el grupo de animales CO (ANOVA 'genotipo': $F_{1,27}=7.85$; $p=0.01$; figura 42B). El tratamiento con melatonina aumentó el número de neuronas ChAT⁺ tanto en los animales TS como en los CO (ANOVA 'tratamiento': $F_{1,27}=4.78$; $p=0.039$; figura 42B). Las diferencias encontradas en el número de neuronas ChAT⁺ en el septo medial de los ratones TS respecto al de los animales CO tratados con vehículo (CO vehículo vs. TS vehículo: $t=1.83$, $p=0.046$) desaparecieron después de tratar con melatonina al grupo TS (CO vehículo vs. TS melatonina: $t=0.233$, $p=0.299$) (figura 42B).

A)

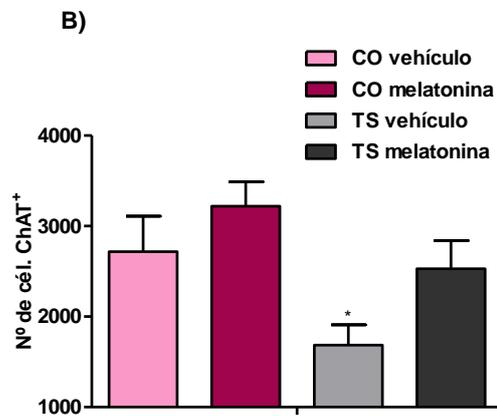
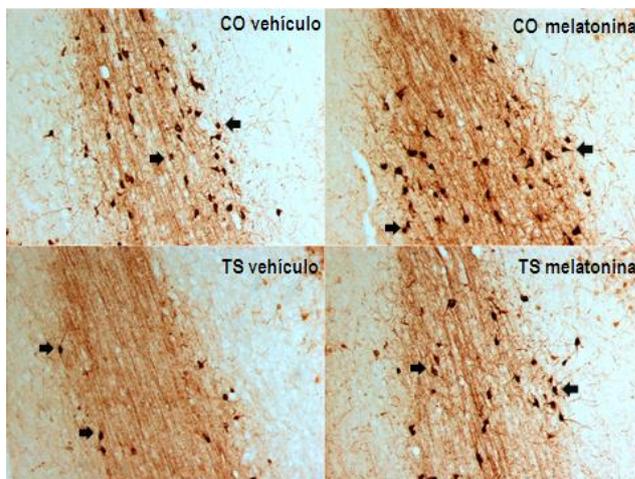


Figura 42. (A) Imágenes representativas de microscopía óptica de neuronas ChAT⁺ en el septo medial de los ratones TS y CO tratados con melatonina o con vehículo durante la etapa adulta. (B) Medias ± E.E.M. del número total de neuronas ChAT⁺ cuantificadas en el septum medial de los cuatro grupos experimentales. * $p<0.05$ TS vs. CO. Prueba de Bonferroni tras ANOVAs significativos.

1.5.2. Efectos sobre el desarrollo de la neuropatología de tipo Alzheimer: niveles de expresión de la proteína APP y de los péptidos neurotóxicos β -amiloides ($A\beta$ 1-40 y $A\beta$ 1-42) en la corteza e hipocampo

Para evaluar los efectos del tratamiento crónico con melatonina sobre los niveles de expresión de la proteína APP en la corteza y en el hipocampo se realizó la técnica de western blot. Como refleja la figura 43A, el análisis de las bandas obtenidas (figura 43B) mostró mayores niveles de expresión de la proteína APP (120 KDa) en los ratones TS, respecto a sus hermanos euploides, tanto en la corteza como en el hipocampo (ANOVA 'genotipo', corteza, $F_{1,21}=16.50$; $p=0.001$; hipocampo, $F_{1,21}=21.98$; $p<0.001$). La melatonina no redujo la expresión de la proteína APP en el hipocampo, pero provocó una ligera disminución en la corteza, aunque esta no alcanzó la significación estadística (ANOVA 'tratamiento': corteza, $F_{1,21}=3.77$; $p=0.06$; hipocampo, $F_{1,21}=0$; $p=0.99$). Sin embargo, los análisis *post hoc* revelaron que las diferencias encontradas en los niveles de expresión de la proteína APP en la corteza, entre los animales TS tratados con vehículo y el grupo CO (TS vehículo vs. CO vehículo: $t=4.2$, $p=0.008$), dejaron de ser significativas después del tratamiento con melatonina (TS melatonina vs. CO vehículo: $t=2.06$, $p=0.09$; figura 43A).

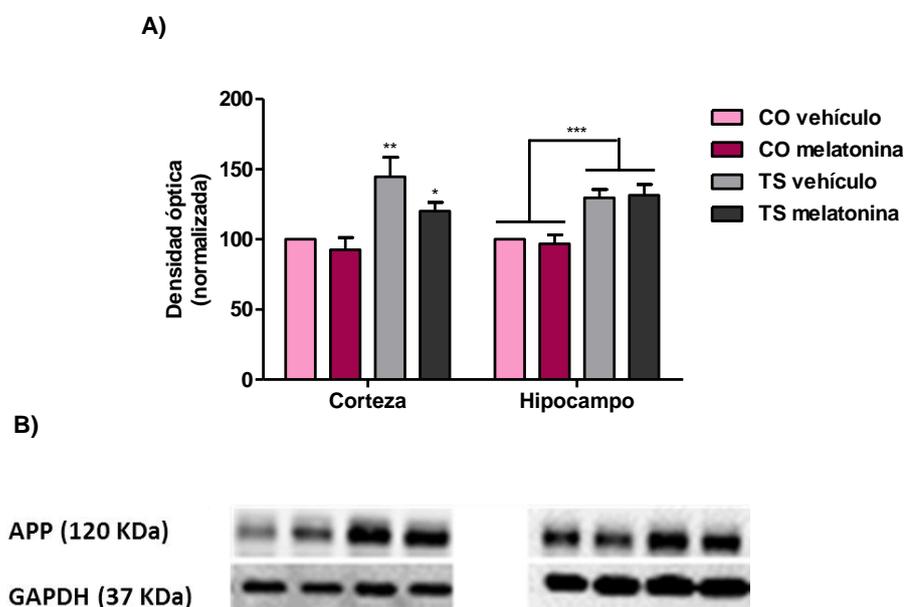


Figura 43. (A) Análisis mediante western blot de los niveles de expresión de la proteína APP en la corteza e hipocampo de los ratones TS y CO tratados con melatonina o vehículo durante la etapa adulta. Los datos se expresan como las medias \pm E.E.M. del porcentaje de variación de densidad óptica con respecto al valor medio del grupo CO tratado con vehículo (considerado como el 100 %). **(B)** Imágenes representativas de las bandas correspondientes a las proteínas APP (120 KDa) y a la utilizada como control interno GAPDH (37KDa). * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ TS vs.CO. Prueba de Bonferroni tras ANOVAs significativos.

Resultados

A continuación, los niveles de los péptidos β -amiloides ($A\beta$ 1-40 y $A\beta$ 1-42) en el cerebro de los animales TS y CO tratados con melatonina o vehículo durante la etapa adulta (figura 44A, 44B) se cuantificaron mediante la técnica ELISA. El análisis de los resultados demostró que los niveles de los péptidos $A\beta$ 1-40 (figura 44A) y $A\beta$ 1-42 (figura 44B) fueron mayores en los ratones TS tratados con vehículo, tanto en el hipocampo (ANOVA 'genotipo' $A\beta$ 1-40: $F_{1,21}=35.19$; $p<0.001$; $A\beta$ 1-42: $F_{1,21}=16.62$; $p=0.001$) como en la corteza (ANOVA 'genotipo' $A\beta$ 1-40: $F_{1,21}=22.33$; $p<0.001$; $A\beta$ 1-42: $F_{1,21}=19.16$; $p<0.001$). El tratamiento con melatonina no redujo los niveles de ninguno de los dos péptidos en la corteza o en el hipocampo de los animales TS. Sin embargo, los análisis *post hoc* demostraron que el tratamiento con melatonina descendió los niveles del péptido $A\beta$ 1-40 en la corteza del grupo CO (CO melatonina vs. CO vehículo: $t=2.63$, $p=0.027$; figura 44A).

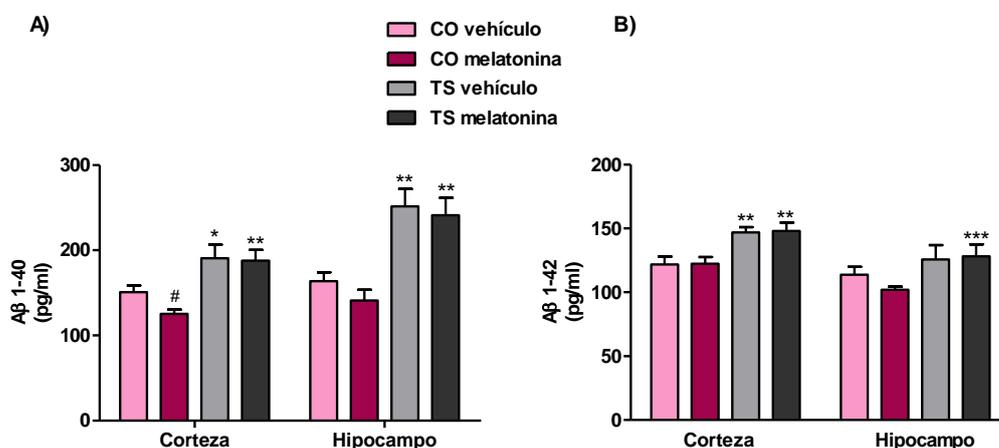


Figura 44. Medias \pm E.E.M de los niveles de los péptidos $A\beta$ 1-40 (A) y $A\beta$ 1-42 (B) detectados mediante la técnica de ELISA en la corteza y en el hipocampo de los animales TS y CO tratados con melatonina o vehículo durante la etapa adulta. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ TS vs. CO; # $p<0.05$ melatonina vs. vehículo. Prueba de Bonferroni tras ANOVAs significativos.

1.5.3. Efectos sobre los niveles de estrés oxidativo en la corteza y en el hipocampo

Para cuantificar el daño oxidativo en el cerebro de los animales medimos los niveles de HNE mediante la técnica de ELISA en la corteza y en el hipocampo de los 4 grupos experimentales.

La figura 45 refleja los niveles de HNE detectados en la corteza y en el hipocampo de los animales TS y CO tratados con vehículo o melatonina durante la etapa adulta. Los ratones TS mostraron niveles significativamente mayores del marcador de estrés oxidativo HNE en la corteza (ANOVA 'genotipo': $F_{1,25}=9,64$; $p=0.005$), pero esas diferencias no alcanzaron la significación estadística en el hipocampo (ANOVA 'genotipo': $F_{1,25}=0.31$; $p=0.12$). Sin embargo,

el análisis *post hoc* de los resultados reveló un aumento de los niveles de HNE en el hipocampo de los animales TS tratados con vehículo con respecto al grupo CO bajo el mismo tratamiento (TS vehículo vs. CO vehículo: $t= 3.61$, $p=0.004$).

Respecto a los efectos del tratamiento crónico con melatonina, su administración redujo de manera significativa los niveles de HNE en la corteza (ANOVA 'tratamiento': $F_{1,25}=6.91$, $p=0.015$), especialmente en los animales CO. Sin embargo, este tratamiento no modificó significativamente los niveles de HNE en el hipocampo de ratones CO (ANOVA 'tratamiento': $F_{1,25}=0.29$; $p=0.59$) aunque hizo desaparecer las diferencias encontradas en los niveles de HNE en el hipocampo entre los ratones TS y CO tratados con vehículo (TS melatonina vs. CO vehículo: $t= 0.82$, $p=0.42$; figura 45).

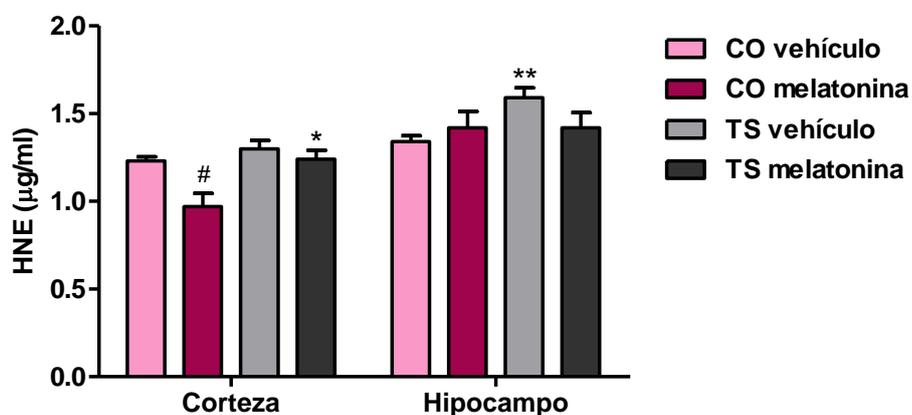


Figura 45. Medias \pm E.E.M. de los niveles de HNE detectados en la corteza y en el hipocampo de ratones TS y CO tratados con melatonina o vehículo durante la etapa adulta. * $p<0.05$; ** $p<0.01$ TS vs. CO; # $p<0.05$ melatonina vs. vehículo. Prueba de Bonferroni tras ANOVAs significativos.

2. ESTUDIO II: Efectos del tratamiento crónico con melatonina durante las etapas pre- y post-natales sobre las alteraciones comportamentales y cognitivas del ratón Ts65Dn

2.1. Efectos sobre la cognición, ansiedad, atención y habilidades sensorimotoras del ratón TS

2.1.1. Cognición

2.1.1.1. Prueba de condicionamiento del miedo (CFC)

En la prueba del CFC, no se encontraron diferencias en el tiempo de inmovilidad entre los distintos grupos de animales en condiciones basales (‘genotipo’: $p=0.45$; ‘tratamiento’: 0.31 ; tabla 16, figura 46) o durante la sesión de entrenamiento (‘genotipo’: $p=0.45$; ‘tratamiento’: 0.78 ; tabla 16, figura 46). Los ratones TS tratados con melatonina o con vehículo permanecieron menos tiempo inmóviles que los animales CO tanto en la sesión de condicionamiento de miedo a un tono ($p<0.001$, tabla 16, figura 46) como a un contexto visual ($p=0.03$; tabla 16). El tratamiento con melatonina no ejerció ningún efecto sobre el tiempo de inmovilidad en ninguno de los dos genotipos en la sesión 2 ($p=0.09$; tabla 16, figura 46) o en la 3 ($p=0.64$; tabla 16, figura 46) por tanto no modificó la memoria asociativa o la contextual de los ratones TS o CO en el CFC.

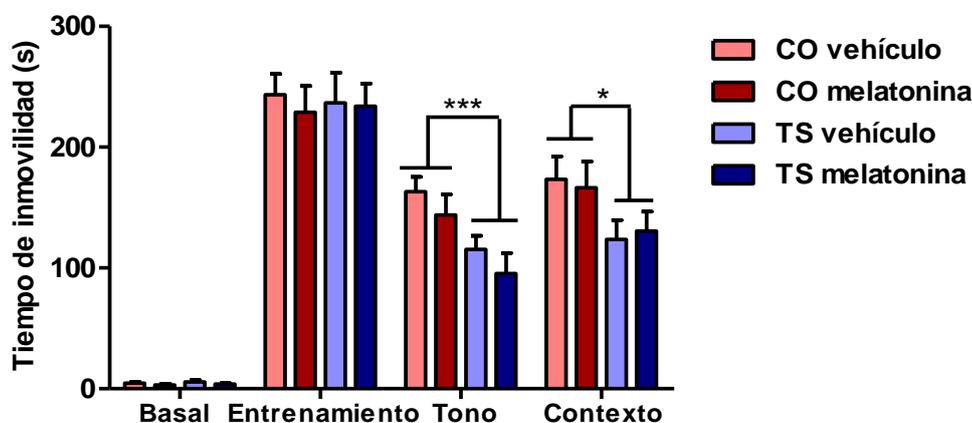


Figura 46. Medias \pm E.E.M. del porcentaje de tiempo de inmovilidad en condiciones basales y durante la sesión de entrenamiento (día 1), en la sesión de evaluación de la memoria de asociación tono-descarga (día 2) y contexto visual-descarga (día 3) en la prueba de CFC realizada por los animales TS y CO tratados con melatonina o vehículo durante la etapa pre- y post-natal. * $p<0.05$, *** $p<0.001$, TS vs. CO. Prueba de Bonferroni tras ANOVAs significativos (la tabla 16 muestra los resultados del análisis estadístico).

Tabla 16. Prueba de condicionamiento del miedo. Valores F y p del MANOVA (genotipo x tratamiento) de cada variable dependiente analizada en el CFC. Los valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$) se presentan en negrita.

	$F_{1,44}$		
	Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
Basal	0.57, $p=0.45$	1.04, $p=0.31$	0.05, $p=0.82$
Entrenamiento	0.57, $p=0.45$	0.76, $p=0.78$	1.55, $p=0.22$
Tono	15.98, $p=0.00$	2.99, $p=0.09$	0.05, $p=0.81$
Contexto	5.04, $p=0.03$	0.21, $p=0.64$	0.05, $p=0.82$

2.1.1.2. Laberinto acuático de Morris (MWM)

La tabla 17 muestra los resultados de los análisis estadísticos de todas las variables evaluadas en este experimento.

a) Sesiones de adquisición

➤ Velocidad

Como muestra la figura 47, no se encontraron diferencias significativas en las velocidades medias de natación durante las 8 sesiones de adquisición entre los distintos genotipos ($p=0.43$; tabla 17, figura 47) o grupos de tratamiento ($p=0.386$; tabla 17, figura 47).

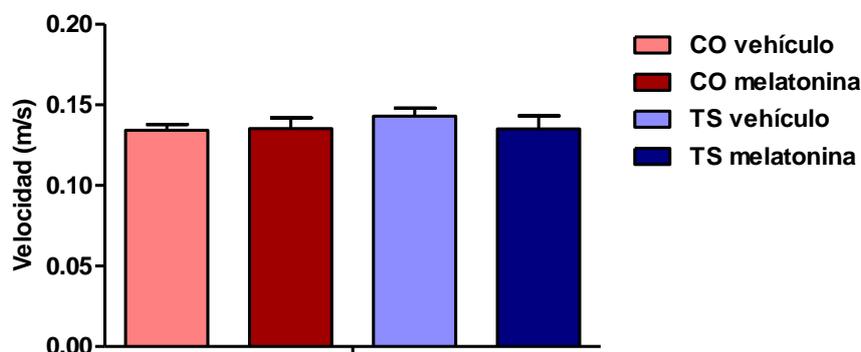


Figura 47. Medias \pm E.E.M. de la velocidad media de natación durante las ocho sesiones de adquisición de los ratones CO y TS tratados con melatonina o vehículo durante las etapas pre- y post-natales.

Resultados

➤ Memoria de referencia

Al igual que en el tratamiento durante la edad adulta, todos los grupos experimentales fueron reduciendo progresivamente la latencia para alcanzar la plataforma a lo largo de las 8 sesiones de adquisición (S1-S8), lo que indica un aprendizaje de la localización de la misma a lo largo de la prueba ($p < 0.001$; tabla 17, figura 48A). Sin embargo, los ratones TS tratados con melatonina o con vehículo tuvieron más dificultades para alcanzar la plataforma que los animales CO bajo el mismo tratamiento a lo largo de las distintas sesiones de adquisición ($p < 0.001$; tabla 17, figuras 48B, 48C).

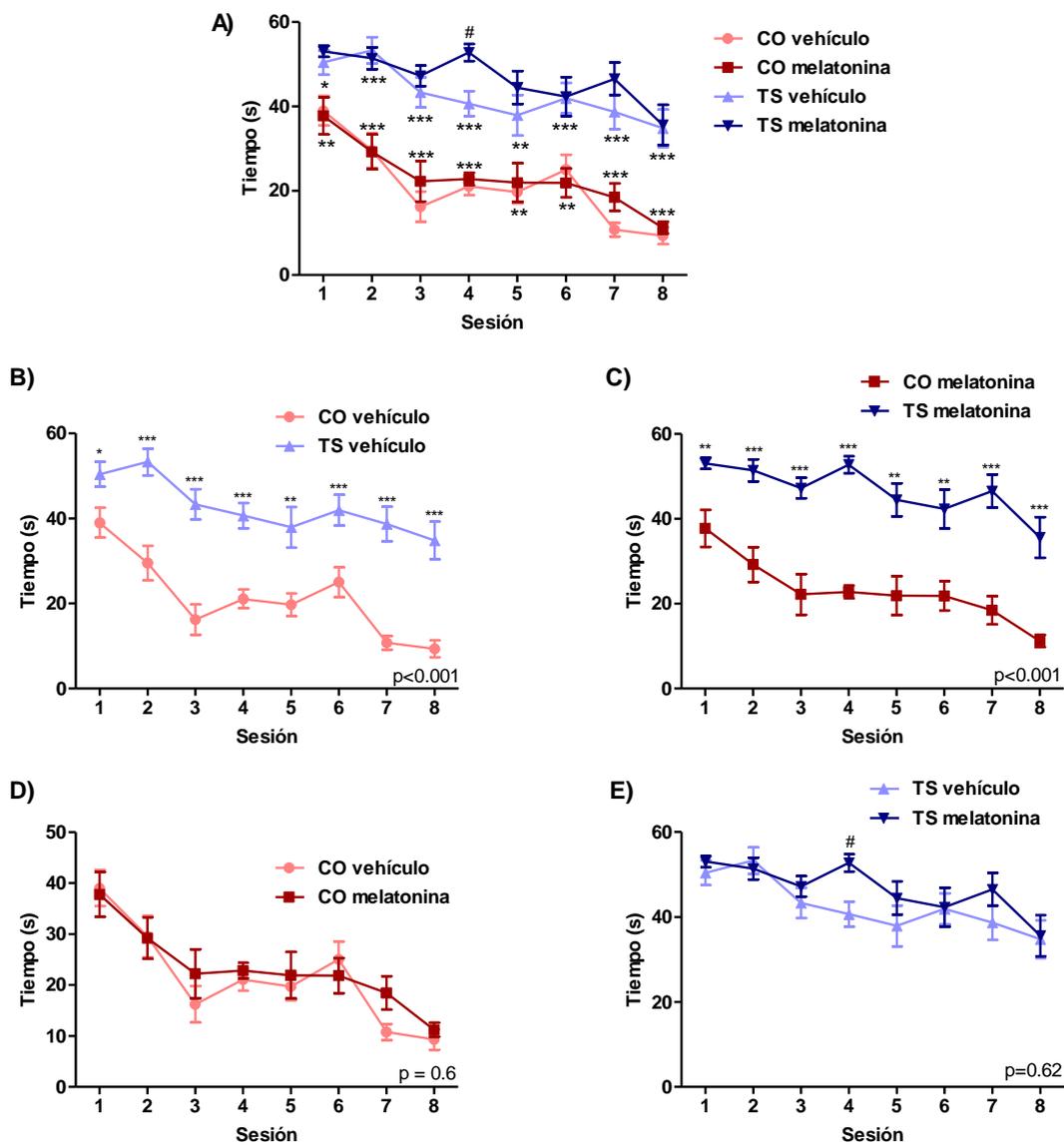


Figura 48. Medias \pm E.E.M. de la latencia de llegada a la plataforma durante las 8 sesiones de adquisición de los 4 grupos de animales (A), de los ratones TS y CO tratados con vehículo (B) y con melatonina (C) y de los ratones CO (D) y TS (E) bajo el mismo tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, TS vs. CO; # $p < 0.05$, melatonina vs. vehículo. Prueba de Bonferroni tras ANOVAs significativos. En la esquina inferior derecha de cada gráfica se muestra la significación (ANOVA) tras la comparación entre cada par de curvas (la tabla 17 muestra los resultados del análisis estadístico).

La melatonina administrada durante la etapa pre- y post-natal, no redujo la latencia de llegada a la plataforma en ninguno de los dos genotipos durante estas sesiones ($p=0.41$; tabla 17, figuras 48D, 48E), lo que indica que en etapas tempranas este tratamiento no mejora su memoria de referencia.

➤ *Memoria de trabajo*

La memoria de trabajo se valoró analizando la ejecución de cada uno de los grupos experimentales a lo largo de los 8 ensayos de cada sesión (para cada ensayo la media de la latencia de llegada a la plataforma en las 8 sesiones). El análisis estadístico (tabla 17) reveló que todos los grupos experimentales redujeron la latencia de llegada a la plataforma a lo largo de los ensayos dentro de una misma sesión ($p=0.04$; tabla 17, figura 49). Los animales TS mostraron una memoria de trabajo deteriorada con respecto a los ratones CO ($p<0.001$; tabla 17, figura 49).

El tratamiento con melatonina no modificó la latencia de llegada a la plataforma de los ratones TS o CO a lo largo de los ensayos (CO vehículo vs. CO melatonina: $p=0.56$; TS vehículo vs. TS melatonina: $p=0.43$; tabla 17, figura 49), lo que indica que el tratamiento con la indolamina no mejoró la memoria de trabajo de los ratones TS o CO.

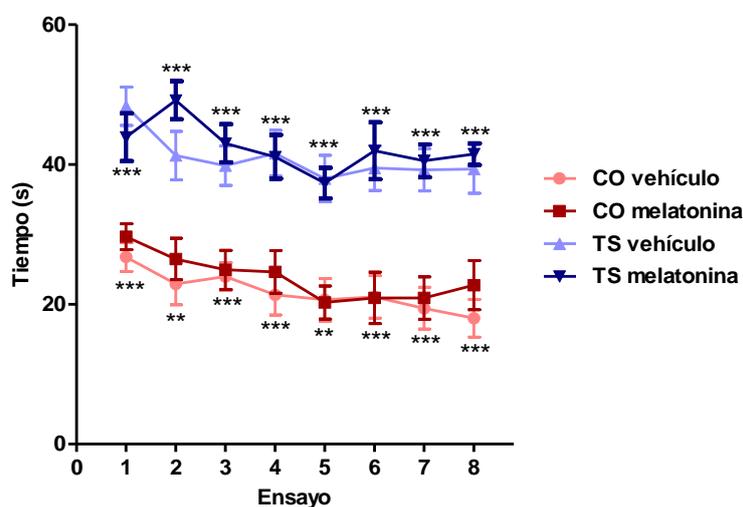


Figura 49. Medias \pm E.E.M. de la latencia de llegada a la plataforma en cada uno de los 8 ensayos de las 8 sesiones de adquisición de los ratones TS y CO tratados con melatonina y con vehículo durante las etapas pre- y post-natales. * $p<0.05$, ** $p<0.005$, *** $p<0.001$, TS vs. CO. Prueba Bonferroni tras ANOVAs significativos (la tabla 17 muestra los resultados del análisis estadístico).

Resultados

➤ Comportamiento tigmotáctico

La estrategia de búsqueda de la plataforma realizada por los ratones TS bajo ambos tratamientos fue inadecuada, ya que pasaron más tiempo nadando por la periferia del tanque que sus respectivos controles ($p < 0.001$; tabla 17, figuras 50A, 50B). El tratamiento con melatonina durante las etapas pre- y post-natales no mejoró el comportamiento tigmotáctico de los animales puesto que no redujo el porcentaje de tiempo que los ratones pasaron nadando por la periferia del tanque ($p = 0.56$; tabla 17, figura 50A). Es decir, la melatonina administrada durante las etapas pre- y post-natales no mejoró el aprendizaje y memoria de procedimiento de los animales TS o CO.

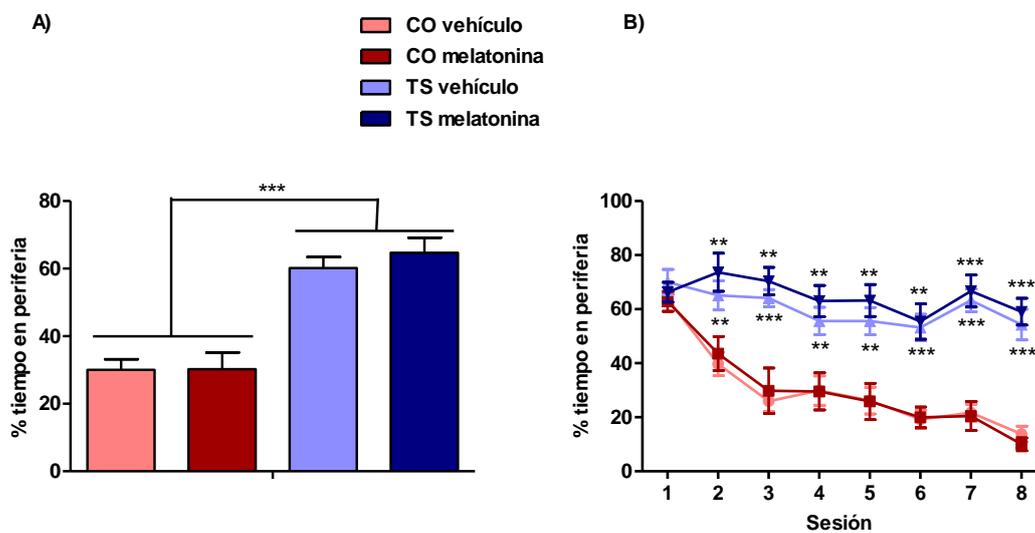


Figura 50. Medias \pm E.E.M. del porcentaje medio de tiempo que pasaron nadando por la periferia del tanque los ratones CO y TS tratados con melatonina o vehículo durante las etapas pre- y post-natales en las 8 sesiones de adquisición (A) y a lo largo de las 8 sesiones de adquisición (S1-S8; B). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ TS vs. CO. Prueba de Bonferroni tras ANOVAs significativos (la tabla 17 muestra los resultados del análisis estadístico).

b) Sesiones de aprendizaje guiado

Durante las sesiones de aprendizaje guiado (S9-S12), los ratones TS bajo ambos tratamientos tendieron a tardar más tiempo que los CO en localizar la plataforma cuando esta era visible ($p=0.05$; tabla 17, figura 51). El tratamiento con melatonina durante la etapas pre- y post-natales no ejerció ningún efecto significativo sobre la ejecución de ninguno de los dos genotipos en estas condiciones experimentales ($p=0.31$; tabla 17, figura 51).

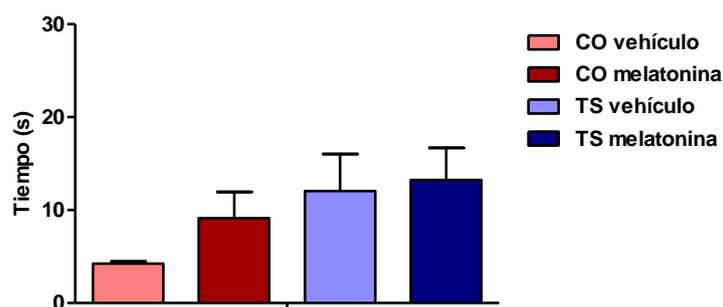


Figura 51. Medias \pm E.E.M. de la latencia para alcanzar la plataforma de los ratones CO y TS tratados con melatonina o vehículo durante las etapas pre- y post-natales durante las sesiones de aprendizaje guiado (S9-12) en la prueba del laberinto acuático de Morris.

Resultados

Tabla 17. 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	Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento	
Memoria de referencia (S1-S8)	MANOVA MR genotipo x tratamiento	F_{7,44}=20.47, p<0.001	F_{1,44}=71.10, p<0.001	F _{1,44} =2.49, p=0.12	F _{1,44} =0.57, p=0.45	
	Comparaciones <i>post hoc</i> entre cada par de curvas de aprendizaje	CO vehículo vs. TS vehículo		F_{1,23}=75.53, p<0.001		
		CO melatonina vs. TS melatonina		F_{1,21}=61.70, p<0.001		
		CO vehículo vs. CO melatonina			F _{1,24} =1.23, p=0.27	
		TS vehículo vs. TS melatonina			F _{1,20} =0.59, p=0.45	
Memoria de trabajo (E1-E8)	MANOVA MR genotipo x ensayo	F_{7,44}=2.41, p=0.04	F_{1,44}=65.11, p<0.001	F _{1,44} =1.81, p=0.18	F _{1,44} =0.29, p=0.59	
	Comparaciones <i>post hoc</i> entre cada par de curvas de aprendizaje	CO vehículo vs. TS vehículo		F_{1,23}=30.27, p<0.001		
		CO melatonina vs. TS melatonina		F_{1,21}=53.88, p<0.001		
		CO vehículo vs. CO melatonina			F _{1,24} =0.34, p=0.56	
		TS vehículo vs. TS melatonina			F _{1,20} =0.67, p=0.43	
Tigmtaxis (S1-S8)	MANOVA MR genotipo x tratamiento	F_{7,44}=20.98, p<0.001	F_{1,44}=61.69, p<0.001	F _{1,44} =0.33, p=0.56	F _{1,44} =0.27, p=0.60	
	Comparaciones <i>post hoc</i> entre cada par de curvas de aprendizaje	CO vehículo vs. TS vehículo		F_{1,23}=49.13, p<0.001		
		CO melatonina vs. TS melatonina		F_{1,21}=24.28, p<0.001		
		CO vehículo vs. CO melatonina			F _{1,24} =0.002, p=0.96	
		TS vehículo vs. TS melatonina			F _{1,20} =0.70, p=0.41	
Sesiones guiadas	Latencia		F _{1,44} =3.95, p=0.05	F _{1,44} =1.03, p=0.31	F _{1,44} =0.38, p=0.53	
	MANOVA genotipo x tratamiento					
Velocidad	MANOVA genotipo x tratamiento		F _{1,44} =0.61, p=0.43	F _{1,44} =0.26, p=0.61	F _{1,44} =0.76, p=0.38	

2.1.2. Ansiedad y actividad general

2.1.2.1. Campo abierto

En esta prueba, de nuevo, los ratones TS tratados tanto con melatonina como con vehículo se mostraron hiperactivos en comparación con los animales CO, ya que recorrieron mayor distancia tanto por la periferia ($p < 0.001$) como por el centro del aparato ($p = 0.02$) y, por tanto, mostraron una mayor actividad horizontal total ($p = 0.001$; tabla 18, figura 52A). Sin

embargo, los animales TS y CO no difirieron en la actividad vertical (número de alzamientos, $p=0.53$; tabla 18, figura 52B). Por último, el tratamiento con melatonina en estas etapas no afectó a la actividad horizontal ($p=0.91$; tabla 18, figura 52A) o vertical ($p=0.21$, tabla 18, figura 52B) en ninguno de los dos genotipos.

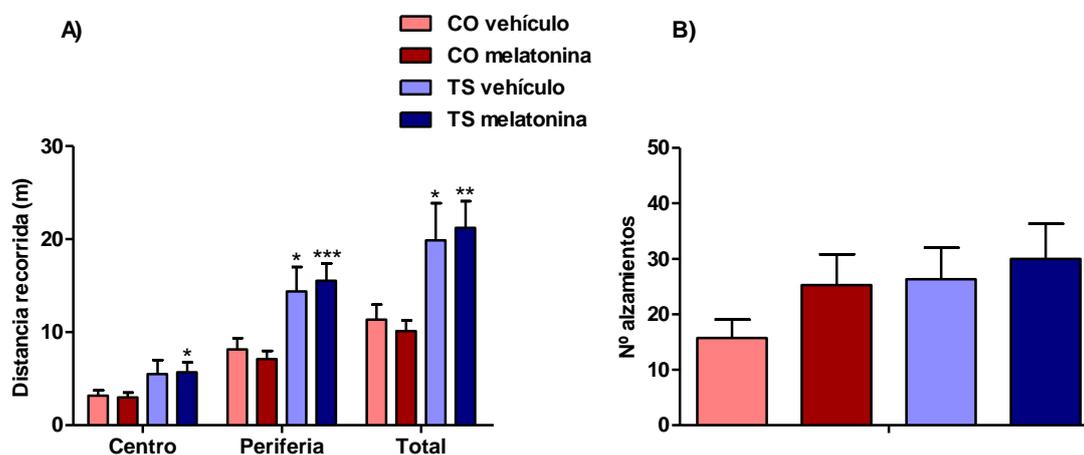


Figura 52. Medias \pm E.E.M. de la distancia recorrida (A) y del número de alzamientos (B) realizados por los ratones TS y CO tras el tratamiento crónico con melatonina o vehículo durante las etapas pre- y post-natales en la prueba del campo abierto. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, TS vs. CO. Prueba de Bonferroni tras ANOVAs significativas. La tabla 18 muestra los resultados del análisis estadístico.

2.1.2.2. Laberinto elevado en cruz

Al contrario que lo encontrado en los ratones TS tratados durante la edad adulta, no se encontraron diferencias significativas en el número de entradas en brazos abiertos o cerrados entre los ratones TS y CO ($p=0.99$; tabla 18, figura 53A) bajo ambos tratamientos ($p=0.10$; tabla 18, figura 53A). Sin embargo, el hecho de que los ratones TS tratados con vehículo realizasen un mayor número de alzamientos que los CO bajo el mismo tratamiento ($p=0.039$; figura 53C) revela que los animales TS también mostraban cierto grado de hiperactividad en esta prueba. Aunque la administración de melatonina no redujo significativamente esta hiperactividad ($p=0.603$; figura 53C) el análisis *post-hoc* de los resultados reveló que el aumento encontrado en el número de alzamientos en el grupo TS tratado con vehículo en relación a sus controles (TS vehículo vs. CO vehículo: $t=2.12$, $p=0.04$; figura 53C), dejó de ser significativo en los animales TS tratados con melatonina comparado con los CO tratados con vehículo (TS melatonina vs. CO vehículo: $t=1.65$, $p=0.11$; figura 53C).

Tanto los componentes cognitivos de la ansiedad (número de conductas de evaluación de riesgo: HDs, SAPs) como los motores (porcentaje de tiempo en brazos abiertos y tiempo de

Resultados

inmovilidad al comienzo del test) fueron similares en ambos genotipos (número de conductas de evaluación de riesgo: $p=0.79$; tabla 18, figuras 53C; porcentaje tiempo brazos abiertos: $p=0.16$, figura 53B; tiempo inmovilidad: $p=0.18$, figura 53D). La melatonina administrada durante las etapas pre- y post-natales no alteró ninguno de los componentes motores (porcentaje de tiempo brazos abiertos: $p=0.95$; tabla 18, figura 53B; tiempo inmovilidad: $p=0.37$; tabla 18, figura 53D) o cognitivos (HD+SAP: $p=0.93$; tabla 18, figura 53C) de la ansiedad.

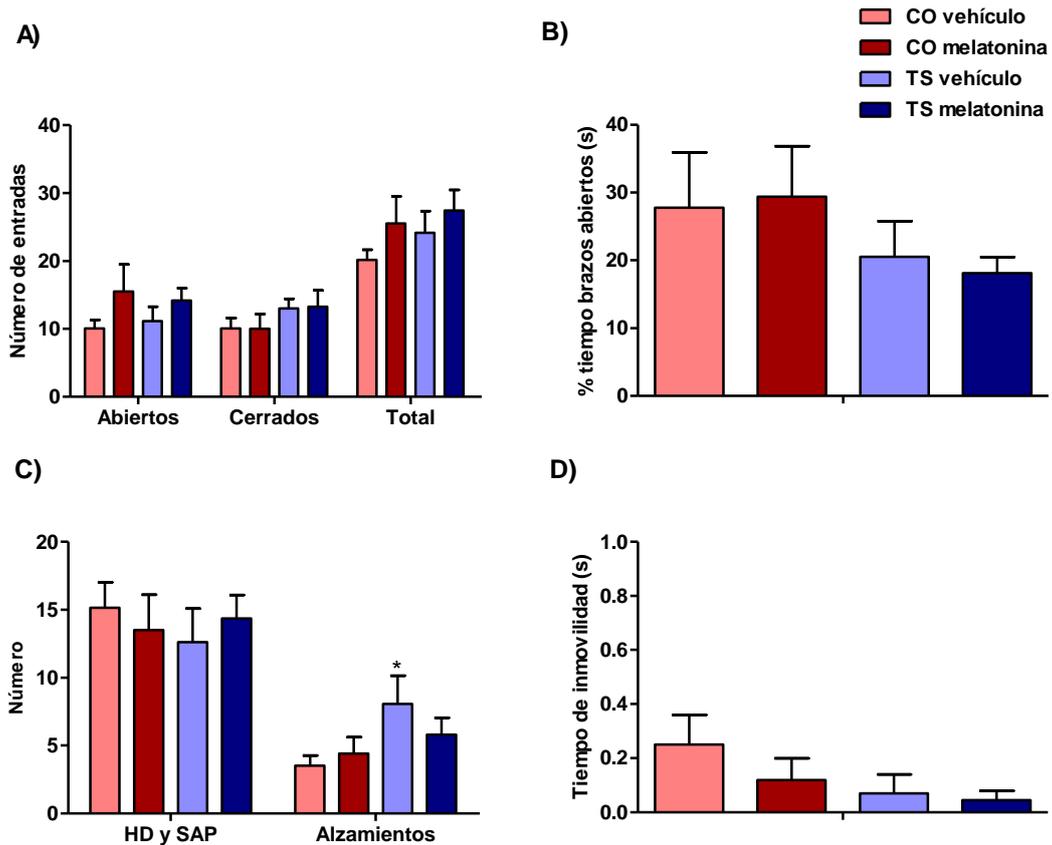


Figura 53. Medias \pm E.E.M. del número de entradas a brazos abiertos, cerrados y del número total de entradas (A), del porcentaje de tiempo que permanecieron en los brazos abiertos (B), del número de conductas de evaluación de riesgo (HD+SAPs) y de alzamientos (C) y del tiempo de inmovilidad inicial (D), realizados por los animales TS y CO tratados con melatonina o con vehículo durante las etapas pre- y post-natales. * $p<0.05$ TS vs. CO. Prueba de Bonferroni tras ANOVAs significativos. La tabla 18 muestra los resultados del análisis estadístico.

Tabla 18. Campo abierto y laberinto elevado en cruz. Valores F y p del MANOVA (genotipo x tratamiento) de cada variable dependiente analizada. Los valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$) se presentan en negrita.

<i>Campo abierto</i>	F_{1,44}		
	Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
Distancia recorrida: periferia	17.29, p=0.00	0.01, p=0.90	0.23, p=0.88
Distancia recorrida: centro	5.54, p=0.023	0.004, p=0.95	0.38, p=0.84
Distancia recorrida: total	13.71, p=0.001	0.012, p=0.91	0.01, p=0.97
Alzamientos	0.38, p=0.53	1.55, p=0.21	1.88, p=0.177
<i>Laberinto elevado en cruz</i>			
Número de entradas en los brazos abiertos	0.00, p=0.99	2.72, p=0.10	0.26, p=0.60
Número de entradas en los brazos cerrados	2.75, p=0.10	0.00, p=0.99	0.002, p=0.96
Número total de entradas	1.06, p=0.30	1.85, p=0.18	0.15, p=0.69
Tiempo de inmovilidad inicial	1.81, p=0.18	0.79, p=0.37	0.22, p=0.63
Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos	1.99, p=0.16	0.04, p=0.95	0.09, p=0.75
Número de conductas de evaluación del riesgo	0.07, p=0.79	0.006, p=0.93	0.41, p=0.52

2.1.3. Actividad exploratoria y atención: Tabla de agujeros

Durante esta prueba, no se encontraron diferencias significativas debidas al genotipo o al tratamiento en la actividad horizontal (genotipo: $p=0.42$; tratamiento: $p=0.09$; tabla 19) o vertical (genotipo: $p=0.34$, tratamiento: $p=0.12$; tabla 19) entre los distintos grupos de animales. Los ratones TS tratados con vehículo mostraron una mayor actividad exploratoria en relación a los animales CO bajo el mismo tratamiento, ya que realizaron un mayor número de exploraciones de los agujeros ($p=0.02$; tabla 19). La melatonina administrada durante las etapas pre- y post-natales redujo de forma significativa el número de exploraciones y el tiempo de exploración de agujeros en los animales TS y CO ($p=0.003$; tabla 19). Además, el tratamiento con melatonina también disminuyó el número de repeticiones en agujeros previamente explorados en ambos genotipos (índice ABA, $p=0.001$; tabla 19). Sin embargo, este menor número de repeticiones fue debido, en parte, al menor número de exploraciones realizadas por los ratones TS y CO tratados con melatonina, ya que cuando el índice ABA fue corregido con el número de

Resultados

exploraciones, no se encontraron diferencias entre los distintos grupos de animales (ABA/número de exploraciones; $p=0.06$; tabla 19). Por lo tanto, aunque el tratamiento con melatonina redujo la conducta exploratoria de los animales no ejerció ningún efecto sobre su atención en esta prueba.

Tabla 19. Medias \pm E.E.M. de las puntuaciones obtenidas por los diferentes grupos experimentales. Valores F y p del MANOVA (genotipo x tratamiento) de cada variable dependiente analizada. Los valores estadísticamente significativos ($p<0.05$) se presentan en negrita. * $p<0.05$, TS vs. CO; # $p<0.05$, melatonina vs.vehículo. Prueba de Bonferroni tras ANOVAs significativos.

	Vehículo		Melatonina		Genotipo	F _{1,44} Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
	TS	CO	TS	CO			
Distancia (m)	5.88 \pm 0.57	7.46 \pm 0.92	8.16 \pm 1.02	8.36 \pm 1.20	0.64, p=0.42	2.85, p=0.09	0.36, p=0.54
Número de alzamientos	8.00 \pm 2.54	9.85 \pm 2.15	11.5 \pm 2.84	14.71 \pm 2.91	0.91, p=0.34	2.47, p=0.12	0.06, p=0.79
Número de exploraciones	29.2* \pm 3.77	20.14 \pm 1.80	18.40# \pm 3.09	15.2# \pm 1.48	5.76, p=0.02	9.49, p=0.003	1.33, p=0.25
Tiempo de exploración (s)	32.43 \pm 6.36	33.21 \pm 5.70	14.40# \pm 3.09	24.05 \pm 4.35	0.98, p=0.32	6.69, p=0.01	0.71, p=0.40
Índice ABA	7.08 \pm 0.94	5.42 \pm 0.64	3.90# \pm 0.83	3.28# \pm 0.64	2.18, p=0.14	12.04, p=0.001	0.46, p=0.50
ABA/nº exploraciones	0.26* \pm 0.02	0.28 \pm 0.03	0.19 \pm 0.02	0.21 \pm 0.04	0.33, p=0.56	3.54, p=0.06	0.01, p=0.89

2.1.4. Habilidades sensorimotoras

2.1.4.1. Batería de pruebas sensorimotoras

En la batería de pruebas para evaluar las habilidades sensoriales y motoras de los ratones tratados con melatonina desde etapas tempranas del neurodesarrollo no se observaron diferencias entre animales TS o CO bajo ambos tratamientos en la visión, la respuesta a un estímulo auditivo, la fuerza de agarre, el reflejo prensil, la capacidad de tracción o el equilibrio. Por tanto el tratamiento con melatonina durante las etapas pre- y post-natales no se alteraron las distintas habilidades sensoriales o motoras analizadas en ratones TS o CO a los 4-5 meses de edad (tabla 20).

Tabla 20. Medias \pm E.E.M. de las puntuaciones obtenidas por los ratones TS y CO después del tratamiento crónico con melatonina o vehículo durante las etapas pre- y post-natales. Valores F y p del MANOVA (genotipo x tratamiento) de cada variable dependiente analizada.

	Vehículo		Melatonina		F _{1,44}			
	CO	TS	CO	TS	Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento	
Visión	2.42 \pm 0.17	2.50 \pm 0.19	2.50 \pm 0.20	2.27 \pm 0.19	0.163, p=0.68	0.16, p=0.68	0.59, p=0.44	
Respuesta sobresalto	1.28 \pm 0.16	1.08 \pm 0.08	1.07 \pm 0.07	1.36 \pm 0.20	0.10, p=0.74	0.05, p=0.81	3.22, p=0.07	
Sensibilidad táctil	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.07 \pm 0.07	0.00 \pm 0.00	0.81, p=0.37	0,81, p=0.37	0.81, p=0.37	
Reflejo de enderezamiento	3.00 \pm 0.00	3.00 \pm 0.00	3.00 \pm 0.00	3.00 \pm 0.00				
Fuerza agarre	3.00 \pm 0.14	2.75 \pm 0.13	3.00 \pm 0.10	3.00 \pm 0.19	0.75, p=0.38	0.75, p=0.38	0.75, p=0.38	
Equilibrio	Madera	2.07 \pm 0.16	2.16 \pm 0.16	2.57 \pm 0.25	2.09 \pm 0.09	1.05, p=0.31	1.27, p=0.26	2.34, p=0.13
	Aluminio	1.14 \pm 0.49	0.50 \pm 0.23	1.64 \pm 0.58	0.90 \pm 0.54	1,91, p=0.17	0.83, p=0.36	0.08, p=0.92
Latencia madera	19.60 \pm 0.39	20.00 \pm 0.00	20.00 \pm 0.00	20.00 \pm 0.00	0.81, p=0.37	0.81, p=0.37	0.81, p=0.37	
Latencia aluminio	7.42 \pm 1.77	6.58 \pm 1.69	11.39 \pm 1.86	8.04 \pm 2.21	1.22, p=0.27	2.04, p=0.15	0.43, p=0.51	
Reflejo prensil	2.28 \pm 0.28	2.50 \pm 0.23	2.85 \pm 0.09	2,36 \pm 0.27	0.36, p=0.55	0,87, p=0.35	2.31, p=0.13	
Capacidad de tracción	2.92 \pm 0.70	2.50 \pm 0.66	1.21 \pm 0.45	2.451 \pm 0.74	0.39, p=0.53	1.84, p=0.18	1.65, p=0.20	
Prueba percha	Latencia caída	42.28 \pm 6.81	43.75 \pm 6.2	37.14 \pm 5.96	37.18 \pm 7.51	0.01, p=0.91	0.77, p=0.38	0.01, p=0.91
	Desplazamientos	4.28 \pm 0.89	3.83 \pm 0.57	4.50 \pm 1.03	3.45 \pm 0.81	0.73, p=0.39	0.009, p=0.92	0.11, p=0.73
	Latencia llegada	35,71 \pm 5.46	32.41 \pm 6.05	30.85 \pm 5.79	40.90 \pm 6.09	0.33, p=0.56	0.096, p=0.75	1.29, p=0.26

2.1.4.2. Actividad espontánea: Actimetría

Al igual que lo observado tras el tratamiento durante la edad adulta, todos los grupos de animales mostraron un ritmo diario de actividad normal a lo largo del ciclo de 24 horas, es decir, fueron más activos durante el periodo de oscuridad que durante el de luz (figura 54A). El análisis de la actividad espontánea no reveló ningún efecto significativo debido al genotipo, (fase oscura: F_{1,44}=0.47, p=0.49; fase luminosa: F_{1,44}=1.17, p=0.28; figura 54B), al tratamiento (fase oscura: F_{1,44}=0.02, p=0.89 ; fase luminosa: F_{1,44}=0.154, p=0.697; figura 54B) o a la interacción entre ambos (fase oscura: F_{1,44}=0.86, p=0.36; fase luminosa: F_{1,44}=0.38, p=0.54; figura 54B), es decir, todos los grupos experimentales mostraron una actividad espontánea similar a lo largo

Resultados

del día y de la noche. Por tanto, la melatonina administrada durante las etapas pre- y post-natales no modificó la actividad locomotora espontánea de los animales.

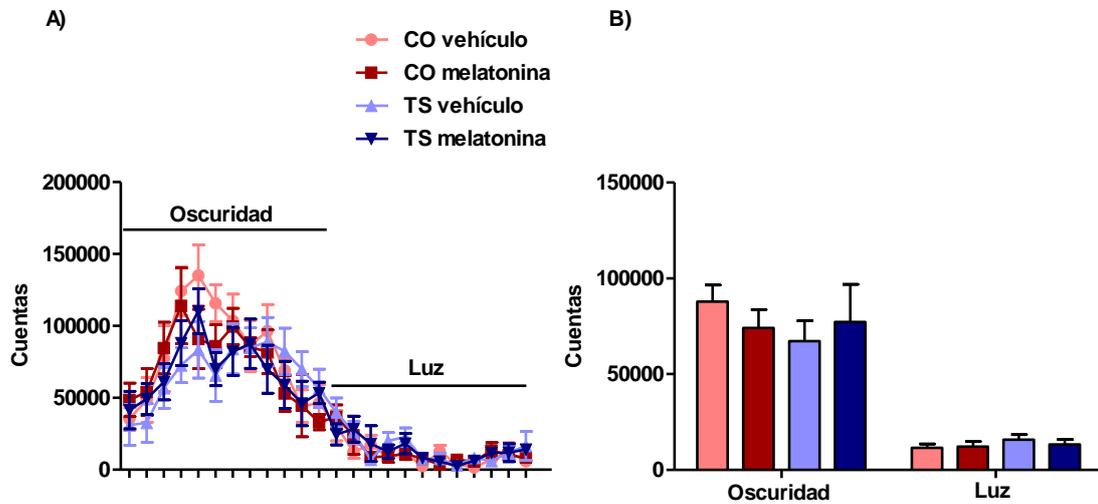


Figura 54. Medias \pm E.E.M del número total de cuentas realizadas por los ratones CO y TS tratados con melatonina o vehículo durante las etapas pre- y post-natales en su jaula habitual a lo largo de un ciclo completo de luz/oscuridad de 24 horas **(A)** y del número medio de cuentas realizadas por cada grupo en los periodos de luz y oscuridad **(B)**.

2.1.4.3. Coordinación motora: Rotarod

De manera consistente con lo observado en el estudio del tratamiento con melatonina a ratones adultos, no se observaron alteraciones en coordinación motora en ratones TS o CO tratados con melatonina o vehículo desde etapas tempranas del neurodesarrollo. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas debido al genotipo o al tratamiento en la latencia de caída de los distintos grupos de animales mientras el rodillo giraba a distintas velocidades constantes (ANOVA 'genotipo': $F_{1,44}=3.16$; $p=0.08$; 'tratamiento': $F_{1,44}=0.09$; $p=0.75$; figura 55A) o durante el ciclo de aceleración (ANOVA 'genotipo': $F_{1,44}=0.61$; $p=0.43$; 'tratamiento': $F_{1,44}=0.02$; $p=0.88$; figura 55B).

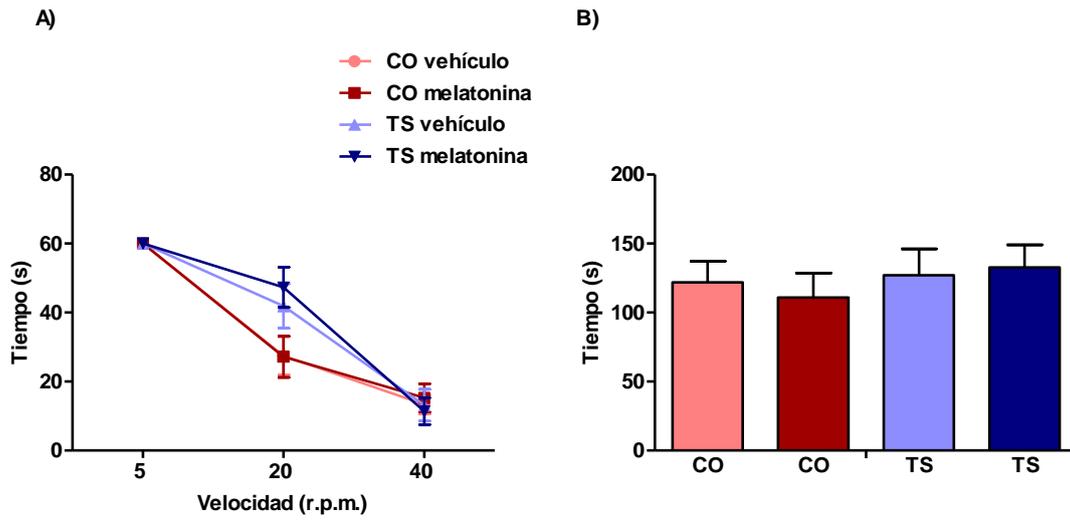


Figura 55. Medias \pm E.E.M. de la latencia de caída a distintas velocidades constantes **(A)** y de la latencia de caída durante el ciclo de aceleración **(B)** realizadas por los ratones CO y TS tratados con melatonina o vehículo durante las etapas pre- y post-natales.

Discusión

Una característica común en el SD y en el ratón TS es la temprana aparición de un exceso de estrés oxidativo durante las primeras etapas del desarrollo (Shichiri et al., 2011; Lockrow et al., 2011; Perluigi y Butterfield, 2012) que se agrava con la edad acelerando la neurodegeneración y produciendo un envejecimiento prematuro del cerebro (Busciglio et al., 2007; Zigman y Lott, 2007; Perluigi y Butterfield, 2011; 2012; Di Domenico et al., 2013; Valenti et al., 2014). Este proceso, unido al aumento de dosis de algunos genes del HSA21, como el *APP*, contribuyen a la aparición de diversas alteraciones neuromorfológicas y electrofisiológicas y juegan un papel fundamental en la progresión del deterioro cognitivo que se observa en el cerebro con SD.

Hasta la fecha se han propuesto y evaluado diferentes tratamientos farmacológicos sin que ninguno haya demostrado tener un efecto beneficioso sobre las alteraciones del desarrollo motor, social, intelectual o de expresión verbal en las personas con SD que aparecen desde etapas tempranas del desarrollo (Gardiner et al., 2004; Lott et al., 2010) o sobre la degeneración cognitiva que se produce en etapas más avanzadas. Es decir, en la actualidad, no existe ningún tratamiento farmacológico eficaz para paliar la discapacidad intelectual de las personas con SD.

Una de las estrategias farmacológicas propuestas para retrasar el deterioro cognitivo en las personas con SD (Ani et al. 2000) ha sido la utilización de fármacos que reduzcan el estrés oxidativo. Aunque hasta la fecha, ningún compuesto antioxidante ha demostrado ejercer efectos procognitivos en personas con SD (Lott et al., 2011).

En esta tesis doctoral se evalúan los efectos neuroprotectores de la administración exógena de melatonina para prevenir o retrasar el deterioro cognitivo en un modelo murino de SD, el ratón TS. Además, esta tesis trata de dilucidar los mecanismos de actuación de esta indolamina a través de la evaluación de sus efectos sobre las alteraciones cerebrales (hipocelularidad, déficits en la plasticidad y conectividad sináptica, degeneración neuronal, exceso de estrés oxidativo y desarrollo de la patología de tipo Alzheimer) responsables del fenotipo cognitivo que presenta el ratón TS.

1. Efectos del tratamiento crónico con melatonina durante la edad adulta y durante las etapas pre- y post-natales sobre las alteraciones cognitivas, neuromorfológicas y electrofisiológicas y sobre la neurodegeneración del ratón TS.

En este trabajo hemos evaluado los efectos neuroprotectores del tratamiento crónico con melatonina, un antioxidante endógeno, en dos momentos diferentes de la vida de los ratones TS, por un lado, administrándola durante la etapa adulta y evaluando sus efectos entre los 10-12 meses de edad y, por otro, administrándola desde la etapa pre-natal y durante los primeros meses de vida y evaluando sus efectos a partir del quinto mes de vida.

Para evaluar la eficacia de la administración oral de melatonina se midieron los niveles de excreción en orina de un compuesto derivado del metabolismo de la melatonina en los animales que recibieron el tratamiento durante la etapa adulta, el aMLT. Se observó que los animales tratados con melatonina mostraban mayores niveles de aMLTs excretados en orina que aquellos que fueron tratados con vehículo, lo que sugiere que esta neurohormona fue adecuadamente incorporada a la circulación, distribuida por el organismo y finalmente, degradada y excretada a través de la orina. En este estudio observamos que las oscilaciones diarias de los niveles de esta hormona fueron normales en todos los grupos de animales, de manera que durante la noche los niveles de aMLTs en orina fueron mayores que los encontrados durante el día. Al igual que en trabajos anteriores (Rasmussen et al., 1999), en este estudio, la melatonina administrada de manera oral no alteró la cantidad de bebida consumida por los animales, por lo tanto, parece que la adición de melatonina al agua de bebida es una manera eficiente de administrar esta indolamina (Matsubara et al., 2003; Olcese et al., 2009).

Con la edad, la producción de melatonina disminuye (Reiter et al., 1986; 2003). Esta reducción ha sido relacionada con el deterioro cognitivo y con la neurodegeneración cerebral asociada a la edad (Reiter et al., 1998). En la población con SD, existe cierta controversia sobre los niveles endógenos de melatonina. Por un lado, Uberos et al. (2010) describieron niveles plasmáticos de melatonina más bajos en niños con SD que en niños normales. Sin embargo, Reiter et al. (1996) concluyeron que la producción circadiana de melatonina está conservada en personas con SD de edades comprendidas entre los 3 y los 55 años. En el presente trabajo, de manera consistente con los resultados obtenidos en el estudio de Reiter (1996), no se encontraron diferencias en la excreción diurna o nocturna de melatonina entre ratones TS o CO bajo la misma condición de tratamiento lo que sugiere que, al menos, durante la etapa adulta, la cantidad de melatonina secretada desde la glándula pineal a la circulación es similar en ambos genotipos.

1.1. Efectos sobre las alteraciones cognitivo-conductuales

1.1.1. Cognición

Diversos estudios han puesto de manifiesto que la administración exógena de melatonina reduce los procesos neurodegenerativos y mejora los déficits cognitivos en varios modelos animales (Matsubara et al., 2003; Feng et al., 2004; Olcese et al., 2009; Dragicevic et al., 2011; Jeong et al., 2012). Para evaluar los efectos de la administración de melatonina sobre las alteraciones cognitivas que presenta el ratón TS se utilizó la prueba del MWM. A pesar de tratarse de una tarea que causa cierto grado de estrés, este paradigma es el más utilizado para estudiar el aprendizaje y la memoria espacial dependiente del hipocampo (Morris, 1984). Los ratones TS tratados con vehículo en ambas etapas de la vida (pre- y post-natal y adulta) mostraron un deterioro en el aprendizaje dependiente de hipocampo en la prueba del MWM, con marcados déficits en todos los aspectos cognitivos evaluados: memoria de trabajo, de referencia y aprendizaje de procedimiento. Estos resultados confirman los déficits previamente encontrados en este ratón a diferentes edades al ejecutar esta prueba (Escorihuela et al., 1995; Rueda et al., 2008; Rueda et al., 2010; Martínez-Cué et al., 2013; Garcia-Cerro et al., 2014). Además, estos resultados también son consistentes con otros estudios que demuestran que el ratón TS presenta alteraciones tanto en la memoria de trabajo como en la de referencia en otras pruebas cognitivas que requieren la integridad del hipocampo como el laberinto radial (Demas et al., 1996) y laberinto en T (Belichenko et al., 2007). De manera consistente con otros estudios (Escorihuela et al., 1995; Martínez - Cué et al., 2002, 2013; Braudeau et al., 2011b), el ratón TS también mostró una mayor tendencia a nadar por la periferia del tanque (tigmotaxis) para localizar la plataforma. Dado que la plataforma siempre estuvo situada en la zona central del tanque en todas las sesiones, la estrategia de búsqueda utilizada por los ratones TS era menos adecuada que la que utilizaban los animales CO.

La administración crónica de melatonina tuvo distintos efectos sobre el aprendizaje espacial de los animales en la prueba del MWM dependiendo del momento de su administración. Durante la etapa adulta, la melatonina mejoró significativamente la memoria de referencia, la de trabajo y la procedimental, tanto de los ratones TS como de los CO, aunque esta última no alcanzó la significación estadística. Todos estos resultados son consistentes con numerosos estudios que describen que la administración crónica de melatonina disminuye los déficits de aprendizaje y memoria espacial en diferentes modelos animales con deterioro cognitivo, incluyendo modelos de envejecimiento inducido por D-galactosa (Yoo et al., 2012), de exposición a etanol (Baydas et al., 2005), diabetes (Tuzcu et al., 2006), modelos de ovariectomía

Discusión

(Feng et al., 2004b) y diversos modelos de EA (Feng et al., 2004a; 2006; Olcese et al., 2009). Además, el tratamiento con esta indolamina también mejoró la estrategia de navegación en un modelo murino con deterioro cognitivo inducido por dexametasona y en un modelo de rata con hemorragia subaracnoidea (Tongjaroenbuangam et al., 2013; Wang et al., 2013).

Por el contrario, la melatonina administrada durante la etapa pre- y post-natal, no produjo ninguna mejoría en la memoria de referencia, de trabajo o procedimental en ninguno de los dos genotipos. De acuerdo con estos resultados, el trabajo de Cao et al. (2009) también describe déficits en el aprendizaje y memoria espacial en la prueba del MWM después de la administración de melatonina a ratas recién nacidas y a ratas expuestas a plomo, desde el momento del destete hasta el tercer mes de vida.

El hecho de que la melatonina mejore el aprendizaje y memoria espacial en los animales TS adultos y que no ejerza ningún efecto sobre la cognición de los animales tratados durante la etapa pre- y post-natal no parece deberse a cambios en la función motora ya que no se encontraron alteraciones en la velocidad de natación entre los distintos grupos de animales tratados durante la etapa adulta o entre los tratados durante el periodo pre- y post-natal. En este último caso, los cuatro grupos de animales tampoco mostraron diferencias en su ejecución durante las sesiones de aprendizaje guiado en el MWM. Sin embargo, el tratamiento con melatonina durante la etapa adulta si mejoró ligeramente la ejecución en ambos genotipos durante estas sesiones. Aunque se ha demostrado que existe también un importante componente de aprendizaje procedimental en las sesiones de aprendizaje guiado (Whishaw et al., 1986), los resultados obtenidos durante estas sesiones sugieren que la melatonina administrada durante la etapa adulta a los animales TS y CO podría también estar mejorando la coordinación motora y la motivación por escapar de esta situación aversiva.

Las discrepancias encontradas según el momento de la administración de la melatonina (etapa adulta o pre- y post-natal) en la prueba del MWM podrían deberse a que las acciones antioxidantes de la melatonina sean más eficaces durante la edad adulta que durante las primeras etapas de la vida en los animales TS. Aunque en la condición SD el aumento de estrés oxidativo y la alteración de las enzimas antioxidantes están ya presentes en estadíos prenatales, este proceso se acentúa aún más con la edad (Perluigi y Butterfield, 2011; 2012), por lo que es posible que durante los primeros meses de vida otros procesos y/o mecanismos jueguen un papel fundamental en el deterioro cognitivo que presenta este modelo. En este sentido, la administración de SGS-111, un antioxidante neuronal análogo al piracetam, administrado desde la concepción y después del nacimiento, tampoco mejoró la memoria y el aprendizaje espacial

en los animales TS (Rueda et al., 2008b). Además, durante las etapas pre- y post-natales, los efectos neuroprotectores de la melatonina parecen estar mediados mayormente por receptores específicos de esta molécula, más que por sus propiedades intrínsecas antioxidantes (Biran et al., 2014). Por tanto, es posible que durante las etapas pre- y post-natales, la melatonina no esté actuando como antioxidante en el cerebro del ratón TS.

Otra posibilidad es que la dosis de melatonina administrada a los animales sea eficaz en ratones adultos pero no en neonatos y jóvenes. Aunque el perfil farmacocinético de la melatonina está claramente documentado en adultos (Arendt, 1995; Bojkowski y Arendt, 1990), no se dispone de datos farmacocinéticos en neonatos y niños. Recientemente Merchant et al. (2013) estudiaron el perfil farmacocinético de la melatonina en neonatos y durante la primera infancia y afirmaron que éste difiere del de los adultos, ya que a estas edades, la vida media y la tasa de aclaramiento de la melatonina en sangre se prolonga y su volumen de distribución disminuye. Además, teniendo en cuenta que la melatonina es extremadamente lipofílica y dado el bajo contenido en grasas de los neonatos y de los niños durante la primera infancia (10%), comparado con los adultos (20-25 %), la capacidad de esta neurohormona podría estar reducida para distribuirse desde la sangre a los diferentes órganos diana. Por esta razón, la concentración de esta molécula en plasma es más alta que la esperada en comparación con los adultos (Merchant et al., 2013). Además, debido a la presencia de la barrera hematoencefálica, la concentración eficaz de melatonina en el cerebro en desarrollo es desconocida. Por tanto, podría ser que la farmacocinética de la melatonina sea diferente en animales jóvenes y adultos, afectando a su concentración final en el cerebro. En consecuencia, sería necesario llevar a cabo estudios farmacocinéticos para definir la concentración a la cual la melatonina es más eficaz para llevar a cabo sus acciones neuroprotectoras durante los estadios pre- y post-natales en el ratón TS.

Por último, es posible que la melatonina administrada durante las primeras etapas de la vida estuviera ejerciendo algún efecto adverso que afecte a la cognición de los animales TS. En la mayor parte de estudios publicados hasta ahora no se han descrito efectos adversos tras el tratamiento a largo plazo con melatonina en niños (Palm et al., 1997; Jan et al., 2007; Carr et al., 2007; Gitto et al., 2012) o en los estudios realizados con animales a los que se les administró esta neurohormona durante las etapas pre- y post-natales (Jahnke et al., 1999; Uyanikgil et al., 2007; Baka et al., 2010; Watanabe et al., 2012). Sin embargo, aunque son escasos, algunos trabajos describen efectos adversos en modelos animales tras la administración de esta indolamina durante las primeras etapas de la vida. Algunos de estos estudios sugieren que la

Discusión

suplementación con melatonina durante estas etapas en ratas afecta de forma negativa al tamaño de la camada, al crecimiento y peso de las crías, incrementa la mortalidad de las mismas, altera su maduración sexual y los niveles de hormona luteinizante liberada por la adenohipófisis (Colmenero et al. 1991; Singh et al., 2013). Por otro lado, los estudios llevados a cabo por Díaz Rodríguez et al. (1999) mostraron que la administración de melatonina durante la etapa prenatal por vía oral a ratas gestantes retrasa la secreción post-natal de testosterona y algunos neurotransmisores (sustancia P y neuroquinina A) en diversas estructuras cerebrales (hipotálamo, hipófisis, estriado) en la descendencia. Por lo tanto, no podemos descartar que durante el periodo de gestación, la melatonina en los animales TS esté ejerciendo algún efecto adverso de este tipo que pueda dañar las funciones cerebrales dependientes de las áreas afectadas o impedir los efectos beneficiosos que esta hormona ejerce en animales adultos.

En la prueba del condicionamiento del miedo, que evalúa el aprendizaje y la memoria contextual (dependiente del hipocampo) y acústica (independiente del hipocampo) asociados al miedo, los ratones TS jóvenes y adultos tratados con vehículo permanecieron menos tiempo inmóviles que los ratones CO, lo que indica que presentan alteraciones en ambos procesos cognitivos. El hecho de que los animales TS presenten déficits durante la sesión 2 (memoria acústica) podría deberse a que aunque el condicionamiento acústico depende principalmente de la amígdala, una estructura que en los animales TS parece no presentar alteraciones (Salehi et al., 2009; Kleschevnikov et al., 2012a), en este tipo de condicionamiento también participan las cortezas perirrinal, entorrinal y postrinal y el tálamo, estructuras que sí que están dañadas en este modelo animal de SD (Goosens y Maren, 2001; Kholodar-Smith et al., 2008).

La melatonina administrada durante la etapa adulta o durante las etapas pre- y post-natales, no afectó a la memoria acústica o a la contextual de los ratones TS o CO. Nuestros resultados son consistentes con los encontrados recientemente por Yang et al. (2013) que han demostrado que la administración de esta indolamina en ratas no mejora los distintos procesos cognitivos analizados en esta prueba de condicionamiento. El hecho de que la melatonina administrada durante la etapa adulta ejerza un efecto procognitivo en el MWM 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 este tipo de aprendizaje contextual (Anagnostaras et al., 2001; Biedenkapp y Rudy, 2009).

A la vista de los resultados obtenidos, parece claro que la administración crónica de melatonina durante la etapa adulta reduce el progreso del deterioro cognitivo que se produce durante el envejecimiento en este modelo de SD. Sin embargo, nuestros datos sugieren que el tratamiento con melatonina, al menos a la dosis administrada en este estudio, no tiene una acción neuroprotectora durante las primeras etapas del desarrollo en estos animales.

1.1.2. Hiperactividad, ansiedad y atención

Para descartar posibles efectos del tratamiento crónico con melatonina sobre distintas alteraciones comportamentales que presentan los animales TS relacionadas con la ansiedad, la atención y la actividad general y exploratoria, en este estudio se han evaluado los efectos de la melatonina sobre estos aspectos en ambas etapas de la vida utilizando los paradigmas experimentales de la tabla de agujeros, el campo abierto y el laberinto elevado en cruz. De manera consistente con estudios realizados en nuestro y otros laboratorios (Escorihuela et al., 1995; Coussons-Read et al., 1996; Martínez - Cué et al., 2005), los ratones TS se mostraron hiperactivos en comparación con los CO, tanto a los 5 como a los 11 meses de edad, en las pruebas del campo abierto (distancia recorrida en el centro y periferia del aparato), tabla de agujeros (número de desplazamientos y de exploraciones) y laberinto elevado en cruz (número de entradas a los brazos abiertos y alzamientos). Esta hiperactividad que muestran los ratones TS suele atribuirse con frecuencia a una falta de atención apropiada a estímulos relevantes en determinadas situaciones que requieren cautela (Coussons-Read et al., 1996; Martínez - Cué et al., 2006). Además, los déficits en la capacidad de atención podrían influir en las alteraciones de aprendizaje y memoria encontrados en estos animales (Driscoll et al, 2004).

Por su parte, el tratamiento crónico con melatonina no redujo la hiperactividad encontrada en el ratón TS en ninguno de los paradigmas experimentales, tanto en animales tratados desde la etapa pre-natal, como en aquellos que recibieron melatonina durante la edad adulta. Estos resultados son consistentes con los encontrados en estudios realizados en modelos murinos de EA en los que la melatonina no ejerció ningún efecto sobre la actividad de los animales (Olcese et al., 2009). Sin embargo, el tratamiento con esta indolamina durante la etapa adulta aumentó el comportamiento exploratorio en la tabla de agujeros, tanto en animales TS como en los CO. Se ha observado que la melatonina administrada de forma exógena induce efectos similares a la arginina vasotocina produciendo un incremento de la actividad exploratoria (King et al., 1982), por lo tanto, este mecanismo podría mediar el aumento de la actividad exploratoria mostrada por los ratones TS después de la administración crónica de melatonina. Sin embargo, después del tratamiento durante las etapas pre- y post-natales se

produjo un descenso del comportamiento exploratorio en los ratones TS y CO, resultados que son consistentes con los descritos por Pierrefiche et al. (1993). Estos autores atribuyen los efectos ansiolíticos provocados por la melatonina en la tabla de agujeros a sus acciones sobre el sistema benzodiazepínico/GABAérgico (Pierrefiche et al., 1993). Además, se han descrito efectos ansiolíticos y/o analgésicos tras la administración de melatonina en niños (Özcengiz et al., 2011), en crías de ratón (Aubrecht et al., 2014) y en crías de ratas gestantes tratadas con esta neurohormona (Choong et al., 2001). Por tanto, no podemos descartar que la melatonina esté ejerciendo un efecto ansiolítico y/o analgésico sobre los animales cuando es administrada durante las etapas pre- y post-natales.

La melatonina administrada durante la etapa adulta o durante la etapa pre- y post-natal no aumentó los niveles de ansiedad en el campo abierto, ya que la distancia recorrida por el centro del aparato fue similar entre los grupos tratados con vehículo o con melatonina. Sin embargo, en el laberinto elevado en cruz, la melatonina redujo los componentes motores de la ansiedad en ratones TS tratados durante la etapa adulta, al aumentar el porcentaje de tiempo que pasaron en los brazos abiertos. Además de los efectos ansiolíticos y/o analgésicos previamente descritos tras la administración de melatonina en las primeras etapas de la vida, también se han descrito efectos ansiolíticos similares tras el tratamiento con esta indolamina en otros modelos murinos de Alzheimer y en ratas pinealectomizadas durante la etapa adulta (Olcese et al., 2009; Karakas et al., 2011).

1.1.3. Habilidades sensorimotoras

En el estudio del tratamiento con melatonina durante las etapas pre- y post-natales no se observaron diferencias debidas al genotipo en las distintas habilidades sensorimotoras evaluadas. Sin embargo, en el estudio realizado en ratones adultos, aunque los animales TS no mostraron diferencias con respecto a los animales CO en la mayoría de las habilidades sensorimotoras valoradas (visión, respuesta de sobresalto, sensibilidad táctil, reflejo de enderezamiento, fuerza de agarre y equilibrio sobre la barra de madera), sí presentaron alteraciones en el equilibrio en la barra de aluminio, en la coordinación motora en la prueba de la percha y una capacidad de tracción alterada. 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 en ratones TS adultos se encuentran relativamente intactas (Escorihuela et al., 1995; Holtzman et al., 1996; Rueda et al., 2010). El tratamiento con melatonina durante la etapa adulta o durante las etapa pre- y post-natales no afectó a ninguna

de las habilidades sensoriales o a la coordinación motora de los ratones TS y CO. Además, la administración de melatonina no modificó la actividad espontánea que los animales mostraron en su jaula habitual durante un ciclo completo de 24 horas (12luz/12oscuridad).

Por consiguiente, los efectos beneficiosos que la melatonina ejerció a nivel cognitivo en los ratones TS adultos no parecen ser debidos a una mejoría de la coordinación motora, habilidades sensorimotoras y/o en la actividad general de estos animales.

1.2. Mecanismos implicados en los efectos pro-cognitivos causados por la melatonina tras su administración a ratones adultos

Como ya se ha descrito anteriormente, el hipocampo está severamente afectado tanto en el SD como en los ratones TS (Rueda et al., 2012) debido a que presenta numerosas alteraciones neuroquímicas, neuromorfológicas y electrofisiológicas que afectan a la estructura, funcionamiento y plasticidad neuronal (Das et al., 2011; 2013; Rueda et al., 2012). Una pérdida de funcionalidad de esta estructura afectaría por tanto al aprendizaje espacial y a los procesos de consolidación de la memoria (Florian et al., 2004). Aunque en el SD y en el ratón TS algunas de las alteraciones, como los defectos en la neurogénesis hipocampal, ocurren desde estadios prenatales y producen en gran parte las alteraciones cognitivas, hay varios procesos neurodegenerativos (aumento de estrés oxidativo, de los niveles de la proteína APP, la degeneración de determinados grupos neuronales) que aparecen y progresan a lo largo de la vida y deterioran aún más la morfología y función de su cerebro. El hecho de que la melatonina administrada durante la etapa adulta mejore la cognición de los ratones TS, sugiere que los mecanismos implicados podrían ser debidos al restablecimiento o mejoría de alguna de las alteraciones cerebrales implicadas en los déficits cognitivos encontrados en estos animales.

1.2.1. Efectos sobre la hipocelularidad y la neurogénesis hipocampal

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. Al igual que se ha demostrado en diversos estudios (Contestabile et al., 2007; Llorens-Martín et al., 2010; Martínez - Cué et al., 2013), en este trabajo, los animales TS mostraron una menor densidad de neuronas granulares maduras en la GCL del hipocampo. Esta reducción en la densidad celular podría ser debida a un aumento en la muerte celular y/o a una reducción en la proliferación celular en la SGZ del hipocampo. El tratamiento con melatonina durante la etapa adulta normalizó la densidad de células granulares en los ratones TS.

Discusión

Numerosos estudios han demostrado que durante la etapa adulta, la neurogénesis hipocampal es importante para el correcto funcionamiento de los procesos de aprendizaje y formación de nuevas memorias. Así, cuando se realizan manipulaciones genéticas en las que se inhibe la formación de nuevas células, los animales presentan alteraciones en su capacidad para aprender y establecer nuevas memorias (Imayoshi et al., 2008; Dupret et al., 2008). Además, se ha demostrado que la mayoría de los tratamientos que deterioran la neurogénesis hipocampal adulta, también alteran la cognición espacial (Dupret et al., 2008; Deng et al., 2009). De hecho, se ha observado una correlación negativa entre el MWM y el número de células recién nacidas en el DG de ratones TS y sus hermanos euploides (Rueda et al., 2012; Velázquez et al., 2013), es decir, los animales en los que proliferan un menor número de células granulares en el DG ejecutan peor las tareas de memoria dependientes del hipocampo.

Para evaluar los efectos de la administración crónica de melatonina sobre la neurogénesis hipocampal adulta, analizamos diferentes subpoblaciones celulares en esta estructura: células en proliferación (células Ki67⁺) y nuevas neuronas que se encuentran en distintos estadios de diferenciación (identificadas por los anticuerpos anti-DCX y anti-CLR). De acuerdo con los resultados mostrados en diversos estudios (Rueda et al., 2005; Llorens-Martín et al., 2006; Bianchi et al., 2010a; 2010b; Rueda et al., 2010; Velázquez et al., 2013), los ratones TS adultos tenían una menor densidad de células proliferativas y un menor número de ambas poblaciones de neuronas inmaduras en la SGZ del DG. Por tanto, el menor número de células que nacen y se diferencian, parece ser la causa de la hipocelularidad observada en el hipocampo en los ratones TS.

Estudios previos han demostrado que la administración exógena de melatonina revierte o, al menos, atenúa las alteraciones en la neurogénesis durante el envejecimiento en ratones normales (Ramírez-Rodríguez et al., 2009; 2011; 2012) y en diferentes modelos animales de diversas neuropatologías (Rennie et al., 2009; Manda et al., 2009; Crupi et al., 2011; Yoo et al., 2012). De manera consistente, nuestros resultados muestran que la melatonina aumenta la neurogénesis hipocampal adulta en los ratones TS, ya que incrementó la densidad de células proliferativas (células Ki67⁺). Sin embargo, el tratamiento con esta indolamina durante la etapa adulta, no normalizó completamente la densidad de células que se están dividiendo en ratones TS. Esta recuperación parcial de la densidad de células proliferativas podría deberse a que el tratamiento durante la etapa adulta comenzó a los 6 meses de edad y sin embargo, las alteraciones en el ciclo celular y el descenso de la proliferación celular comienzan en estadios tempranos del desarrollo en el ratón TS (Lorenzi et al., 2006; Contestabile et al., 2007; Bianchi

et al., 2010a; 2010b). Por tanto, es posible que el tratamiento con melatonina durante la etapa adulta no recupere la hipocelularidad de los precursores neurogénicos, que ya está establecida desde las primeras etapas pre- y post-natales.

La administración crónica de melatonina a ratones adultos normalizó la densidad de las dos poblaciones de neuronas inmaduras en diferentes estadios de diferenciación, es decir, la densidad de células que expresan DCX y CLR. De acuerdo con este resultado, los estudios realizados *in vitro* e *in vivo* han demostrado que una de las funciones principales de la melatonina sobre la neurogénesis hipocampal del ratón adulto es promover la transformación de las células precursoras en neuronas maduras (Ramírez-Rodríguez et al., 2009; Sotthibundhu et al., 2010). Por lo tanto, a la vista de los resultados del presente estudio, el aumento de la densidad de neuronas granulares maduras inducido por la melatonina en los ratones TS adultos podría deberse, en parte, al aumento del número de los precursores neurogénicos, pero sobre todo, a la promoción de la diferenciación y al aumento de la supervivencia de las nuevas células que nacen.

Por otro lado, el aumento de la muerte celular parece ser otro de los mecanismos implicados en la hipocelularidad del hipocampo y en la alteración de las habilidades cognitivas encontradas en ratones TS. Además, la melatonina también ejerce neuroprotección gracias a sus acciones antiapoptóticas a través de la prevención de la activación de la ruta mitocondrial (Radogna et al., 2008; Maity et al., 2009; Wang et al., 2009). Sin embargo, los procesos de muerte celular, durante el desarrollo o en la etapa adulta, no parecen jugar un papel importante en el menor número de células que presentan estos animales en su cerebro (Rueda et al., 2011; Rueda et al., 2012). Por consiguiente, la neuroprotección mediada por la melatonina en ratones TS es probable que no se deba a sus propiedades antiapoptóticas.

1.2.2. Efectos sobre la plasticidad (LTP) y conectividad sináptica

Hay numerosos estudios que demuestran que paralelamente a su deterioro cognitivo, los ratones TS presentan alteraciones en la plasticidad sináptica del hipocampo. De acuerdo con estos trabajos (Kleschevnikov et al. 2004; Costa y Grybko, 2005; Siarey et al., 2006), el presente estudio muestra que la inducción de la LTP en el hipocampo se encuentra reducida en los ratones TS. El tratamiento con melatonina durante la etapa adulta normalizó completamente la LTP en el área CA1 en los animales TS. De manera consistente con nuestros resultados, se ha visto que la administración crónica de melatonina rescata los déficits en la LTP hipocampal y en la memoria espacial (Liu et al., 2013) después de la inyección intra-hipocampal de A β . Sin embargo,

Discusión

la aplicación aguda de manera directa de esta indolamina a rodajas de hipocampo de ratón y rata inhibe la LTP en la región CA1 (Ozcan et al., 2006; Sutcu et al., 2006; Takahashi y Okada, 2011).

Numerosas evidencias indican que el deterioro en la LTP y en la función cognitiva que presentan los animales TS se debe a un desequilibrio entre la neurotransmisión excitadora e inhibitoria a favor de la inhibición (Kleschevnikov et al., 2004; 2012a; 2012b; Belichenko et al., 2009b), de manera que se modifica el balance excitación/inhibición alterando el funcionamiento coordinado de los sistemas cerebrales. De manera congruente con lo encontrado en estudios anteriores (Rueda et al., 2010; Martínez - Cué et al., 2013), los ratones TS presentaron una densidad reducida de botones sinápticos glutamatérgicos (VGLUT1⁺) y una alta densidad de botones sinápticos GABAérgicos (GAD65⁺) en la capa molecular del hipocampo en relación a los animales control. Los ratones TS mostraban, por lo tanto, un exceso de inhibición hipocampal. La administración crónica de melatonina en los animales TS adultos aumentó la densidad de los marcadores sinápticos glutamatérgicos reduciendo la inhibición. Sin embargo, el tratamiento con esta indolamina no tuvo ningún efecto sobre el área ocupada por los marcadores sinápticos GABAérgicos. El hecho de que la administración de diferentes antagonistas y moduladores alostéricos negativos del receptor GABA_A haya conseguido reducir la inhibición sináptica y rescatar la plasticidad sináptica, las alteraciones neuromorfológicas y cognitivas en este modelo de SD (Rueda et al., 2008; Braudeau et al., 2011b; Martínez - Cué et al., 2013), sugiere que esta reducción de la sobre-inhibición mediada por GABA podría ser uno de los mecanismos por los que mejora la LTP y la cognición en los ratones TS durante la etapa adulta.

Por otro lado, la inducción de la LTP en la vía que une las fibras colaterales de Schaffer y CA1 depende de la activación de los receptores NMDA. Recientemente se ha demostrado que un antagonista selectivo de alta afinidad para el receptor GABA_B mejoró la LTP en ratones TS, a través del aumento de la actividad mediada por el receptor NMDA (Kleschevnikov et al., 2012). La melatonina también es capaz de proteger y aumentar la concentración de las subunidades 2A y 2B del receptor NMDA en el hipocampo de rata (Delibas et al., 2003; Talaei et al., 2010). Por tanto, a nivel postsináptico, un posible mecanismo ejercido por la melatonina para mejorar la LTP en los animales TS podría ser un aumento de la activación de los receptores NMDA. No obstante, la melatonina también podría restaurar la LTP en los ratones TS mediante el aumento de la densidad y/o actividad de las sinapsis glutamatérgicas, como se ha demostrado en nuestro estudio. Además, la restauración de la densidad de células granulares, mencionada previamente, podría mejorar la densidad de sinapsis aferentes desde el DG y aumentar la

eficiencia de la señalización excitadora a través del circuito trisináptico mejorando la LTP en los animales TS.

1.2.3. Efectos sobre la neurodegeneración cerebral

Los efectos pro-cognitivos ejercidos por la melatonina durante la etapa adulta en los animales TS y CO también podrían ser debidos a una reducción de la degeneración de determinadas poblaciones neuronales o a la protección frente a la aparición de determinados procesos que aceleran el envejecimiento del cerebro con SD.

➤ *Efectos sobre la neurodegeneración del sistema colinérgico del prosencéfalo basal*

La pérdida de los *inputs* hipocampales, particularmente la degeneración del sistema colinérgico septo-hipocampal, contribuye a la progresión del deterioro cognitivo, tanto durante el envejecimiento normal como en el SD (Schliebs et al., 2011; Millan Sánchez et al., 2012). De hecho, la reversión de esta neurodegeneración mejora la memoria (Martínez-Serrano et al., 1996). A partir de los 6 meses de edad, en el ratón TS, la degeneración y la consiguiente pérdida de neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal se correlaciona con el deterioro progresivo de la memoria espacial (Granholm et al., 2000; Hunter et al., 2003; Seo et al., 2005). En este estudio se valoró el estado del sistema colinérgico a través del marcaje con anticuerpos anti-ChAT en los distintos grupos de animales. Los resultados mostraron que los ratones TS tratados con vehículo exhibían un número reducido de neuronas ChAT⁺ que se normalizó tras el tratamiento con melatonina. Además, esta neurohormona también aumentó el número de neuronas ChAT⁺ en ratones CO. Estos resultados son consistentes con otros estudios que muestran que el tratamiento crónico con melatonina protege las neuronas motoras colinérgicas del deterioro causado por el estrés oxidativo que resulta al dañar el nervio periférico de ratas adultas (Chang et al., 2008). También se ha observado que la melatonina mejora la actividad de neuronas colinérgicas en un modelo murino de EA (Feng et al., 2004a) y en ratas adultas ovariectomizadas (Feng et al., 2004b) y, además, ejerce efectos neuroprotectores en modelos murinos de enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad (Matsubara et al., 2003; Feng et al., 2004a; Olcese et al., 2009).

Por lo tanto, parece probable que la mejoría en el aprendizaje espacial ejercida por la melatonina en los ratones TS adultos pueda estar al menos parcialmente mediada por la reducción de la degeneración de este grupo neuronal.

➤ *Efectos sobre la neuropatología de tipo Alzheimer*

Como consecuencia de la sobreexpresión del gen *APP*, en el cerebro de las personas con SD y de ratones TS se produce un aumento de la expresión de la proteína APP. Esta sobreexpresión provoca efectos neurotóxicos debido a su metabolismo aberrante y posterior depósito de los péptidos A β que causan neurotoxicidad (Isacson et al., 2002; Salehi et al., 2006). Al igual que en estudios anteriores (Rueda et al., 2010), entre los 11-12 meses de edad los niveles de expresión de la proteína APP en los ratones TS estaban incrementados en la corteza (50%) y en el hipocampo (25%) en comparación con los animales CO. Se han descrito cambios dependientes de la edad, tanto en la cantidad de APP, como en su mRNA, en el cerebro de ratones TS adultos (Salehi et al., 2006; Millan Sanchez et al., 2012). Seo e Isacson (2005) describieron un aumento del 150 % de los niveles de APP en hipocampo de ratonas de 12 meses de edad, mientras que Hunter et al. (2003) no encontraron aumentos de esta proteína hasta los 13-16 meses de edad (250 % en hipocampo, 40 % en córtex). Por tanto, el modesto aumento de los niveles de APP encontrados en este estudio puede ser debido a la edad de los ratones utilizados (11-12 meses), ya que probablemente sean demasiado jóvenes para mostrar niveles tan elevados de APP como los observados en el estudio de Hunter et al. (2003). Además, las diferencias también podrían ser debidas al sexo de los animales utilizados en el presente trabajo y en los estudios anteriores, puesto que, a diferencia de los trabajos mencionados, en esta tesis sólo se han usado ratones macho. Por último, las diferencias también podrían ser debidas a los tejidos utilizados, ya que en nuestro estudio se usó el hipocampo completo, mientras que en el trabajo de Hunter et al. (2003) sólo se examinaron las regiones CA1 y CA2 del hipocampo, excluyendo el DG.

La administración de melatonina durante la etapa adulta no ejerció ningún efecto significativo sobre los niveles de APP en ninguno de los dos genotipos. Aunque redujo ligeramente la diferencia en la expresión cortical de APP en ratones TS y CO, no afectó a los niveles de APP en el hipocampo. Estos hallazgos son consistentes con los resultados de Lockrow et al. (2009) quienes describieron que la vitamina E, un compuesto con propiedades antioxidantes parecidas a las de la melatonina, no producía ningún efecto sobre la producción de APP en ratones TS. Por lo tanto, se puede concluir que el mecanismo que subyace a la mejoría cognitiva tras el tratamiento crónico con melatonina en ratones TS y CO durante la etapa adulta no es debido a la reducción de los niveles del APP en el cerebro. Además, el trabajo llevado a cabo por Matsubara et al. (2003) en un modelo animal de EA demostró que la protección que ejerce la melatonina frente a la neuropatología A β no estaba acompañada de una reducción en los niveles de expresión de la proteína APP, lo que es consistente con la falta de efectos sobre

los niveles de proteína APP tras el tratamiento con melatonina que observamos en nuestro estudio.

En el SD, los incrementos en APP contribuyen a la alteración de la neurogénesis, ya que esta proteína influye en la proliferación de los precursores neuronales (Trazzi et al., 2013). El hecho de que en este estudio la melatonina administrada durante la etapa adulta no reduzca los altos niveles de expresión de la proteína APP en el hipocampo de ratones TS, podría ser una de las razones por las que la restauración de la proliferación celular es parcial en el DG de estos animales tras el tratamiento con esta indolamina.

Aunque en el ratón TS los péptidos A β no se agregan formando placas amiloides u ovillos neurofibrilares, éstos son altamente neurotóxicos y producen alteraciones neuronales y cognitivas en estos ratones. En estudios previos se han descrito niveles elevados de estos péptidos en el cerebro de ratones desde los 4 y 6 meses de edad (Hunter et al., 2003; Netzer et al., 2010). En nuestro estudio, de acuerdo con la expresión de APP, los niveles de los péptidos amiloides A β 40 y A β 42 también estaban elevados tanto en el hipocampo como en la corteza de los ratones TS a los 12 meses de edad.

El tratamiento con melatonina no redujo la cantidad de los dos tipos de β -amiloide analizados en el cerebro de los ratones TS pero sí disminuyó los niveles de A β 40 en la corteza de los ratones CO. La melatonina tiene un importante papel en la regulación del metabolismo del APP, el procesamiento de los péptidos β -amiloides y la prevención de su sobreproducción (Rosales-Corral et al., 2012). Diversos estudios han demostrado que la administración a largo plazo de melatonina inhibe la patología β -amiloide y la neurotoxicidad producida por estos péptidos en modelos animales de EA como el Tg2576 (Matsubara et al., 2003), APP^{swe}/PS1 (Olcese et al., 2009) y A β PP 695 (Feng et al., 2004a; 2006). Aunque tanto los modelos de EA como los ratones TS sobreexpresan el gen APP, el ratón trisómico también sobreexpresa 92 genes ortólogos a los encontrados en el HSA21 (Sturgeon y Gardiner, 2011) y, por esta razón, no es de sorprender que nuestros ratones no respondan de la misma manera al tratamiento con melatonina que los diferentes modelos murinos de EA. Además, se ha descrito en un modelo de EA que el efecto beneficioso que ejerce la melatonina en la neuropatología amiloide es debido a un aumento de la tasa de transporte de los péptidos A β desde el cerebro al plasma, más que a una reducción de los niveles de estos péptidos en el cerebro (Olcese et al., 2009), lo que es coherente con la ausencia de efectos de la melatonina en los niveles de β -amiloide en el cerebro del ratón TS.

Discusión

➤ *Efectos sobre el estrés oxidativo*

Como consecuencia de la sobreexpresión del gen *SOD1*, tanto los individuos con SD como el ratón TS, presentan un aumento del estrés oxidativo cerebral que participa en la neurodegeneración y en el deterioro cognitivo.

De manera consistente con el incremento en distintos marcadores de estrés oxidativo en el ratón TS encontrado en numerosos estudios (Lockrow et al., 2009; Shichiri et al., 2011), en este trabajo los niveles de HNE, un marcador específico de peroxidación lipídica, estaban elevados en el hipocampo de los ratones TS tratados con vehículo en comparación con los ratones CO. Sin embargo, los niveles de HNE en la corteza de los animales TS fueron similares a los de los ratones CO, lo que sugiere que esta región podría estar menos afectada por el estrés oxidativo que el hipocampo.

En nuestro estudio, el tratamiento crónico con melatonina durante la etapa adulta normalizó los niveles de HNE en el hipocampo de ratones TS, por lo tanto, su efecto beneficioso a nivel cognitivo podría ser debido, en parte, a sus propiedades antioxidantes (Reiter, 1997; Olcese et al., 2009; Galano et al., 2011). Aunque el antioxidante neuronal SGS-111 administrado durante la etapa adulta, no mejora la memoria y el aprendizaje en el ratón TS (Rueda et al., 2008b), otros antioxidantes como el α -tocoferol o la vitamina E retrasan el deterioro cognitivo, preservan el sistema colinérgico, mantienen la morfología del hipocampo y normalizan los niveles de estrés oxidativo en el ratón TS adulto. La capacidad de la melatonina para eliminar los radicales libres es el doble que la de la vitamina E (Pieri et al., 1994) y, además, la melatonina es particularmente eficaz, por su facilidad para atravesar la barrera hematoencefálica (Chen et al., 2012). Además de eliminar directamente los radicales libres (Reiter, 1997; Reiter, 1998), la melatonina también disminuye los niveles de estrés oxidativo reduciendo la cadena de transporte de electrones mitocondrial y de esta manera la generación de radicales libres (Jou et al., 2007) y estimulando la actividad de enzimas antioxidantes (Barlow et al., 1995; Olcese et al., 2009). Por tanto, la reducción de la peroxidación lipídica en el hipocampo de los ratones TS tratados con esta neurohormona podría estar implicada en el aumento de la densidad de células granulares y en el retraso del deterioro cognitivo asociado a la edad que se observa en estos animales después del tratamiento con melatonina.

Reflexión final

En este estudio, el tratamiento crónico con melatonina durante la etapa adulta mejoró el aprendizaje espacial y protegió a los ratones TS y CO frente a la degeneración colinérgica sin provocar efectos adversos en los animales. A su vez, la administración de melatonina a ratones TS adultos aumentó de forma significativa la densidad de la población de células proliferativas, de neuroblastos en diferenciación y de células granulares maduras y disminuyó los niveles de peroxidación lipídica. Además, redujo la inhibición sináptica en el hipocampo de los ratones TS y recuperó totalmente la LTP en estos animales. Por tanto, la normalización de la función y/o morfología del hipocampo es, probablemente, la causa de las mejorías cognitivas observadas en los ratones TS tratados con melatonina durante la etapa adulta. Sin embargo, cuando esta indolamina fue administrada durante las etapas pre- y post-natales, no mejoró la cognición de los animales TS.

Diversas farmacoterapias, que incluyen varios antagonistas selectivos del receptor GABA_B, el modulador alostérico negativo de la subunidad $\alpha 5$ de GABA_A RO4938581, el litio, la fluoxetina y el agonista adrenérgico formoterol, mejoran o normalizan la actividad cognitiva de ratones TS jóvenes, así como sus déficits neuromorfológicos y electrofisiológicos (Kleschevnikov et al., 2012; Martínez - Cué et al. 2013; Contestabile et al., 2013; Dang et al., 2013; Stagni et al., 2013).

Sin embargo, en animales TS viejos, como los usados en una parte de este estudio, otros fármacos, como el antagonista no competitivo del receptor NMDA memantina, la vitamina E y el antiinflamatorio minociclina, reducen parcialmente el deterioro cognitivo de estos ratones y algunos marcadores neuropatológicos de envejecimiento (Hunter et al., 2004; Lockrow et al., 2009; Rueda et al., 2010). En nuestro estudio, la administración crónica de melatonina a ratones adultos también mejora parcialmente la cognición en los animales TS. No obstante, ninguno de estos tratamientos ha demostrado tener un perfil multifuncional, rescatando completamente los déficits neuromorfológicos y electrofisiológicos que subyacen a las alteraciones cognitivas del SD como lo ha demostrado el tratamiento crónico con melatonina durante la etapa adulta.

Nuestros resultados aportan evidencias que apoyan el uso de la melatonina en ensayos clínicos con adultos, como terapia preventiva para frenar la progresión del déficit cognitivo que tiene lugar durante el envejecimiento en el SD. Además, la melatonina es normalmente bien tolerada en adultos y no se han observado efectos secundarios importantes tras su administración, por ello su uso ha sido aprobado en humanos.

Conclusiones

El tratamiento crónico con melatonina durante la etapa adulta:

1. Dio lugar a unos niveles del metabolito de la melatonina (aMLTs) significativamente mayores en ratones TS y CO que en los animales tratados con vehículo durante ambas fases del fotoperiodo, lo que sugiere una adecuada incorporación, distribución, degradación y excreción de la misma.

2. Tuvo **efectos procognitivos** en los ratones TS en la prueba del MWM ya que mejoró la memoria de referencia espacial y redujo el comportamiento tigmotático (memoria de procedimiento) de los ratones TS. Sin embargo, no produjo ningún efecto sobre el aprendizaje asociativo en la prueba del condicionamiento del miedo a un contexto en estos animales.

3. No redujo la hiperactividad que presentan los ratones TS en ambientes novedosos o situaciones aversivas.

4. Aumentó la actividad exploratoria tanto en los animales CO como en los TS.

5. No afectó a la atención de los animales.

6. Produjo un efecto ansiolítico en los ratones TS disminuyendo los componentes motores de la ansiedad.

7. No produjo modificaciones relevantes sobre las habilidades sensoriales y/o motoras ni alteró el ritmo diario de actividad durante ambas fases del ciclo luz-oscuridad en animales TS o CO.

8. Mejoró el **fenotipo histológico hipocampal** ya que:

- ✓ Aumentó la densidad de células granulares maduras en el DG de los ratones CO y normalizó la densidad de las mismas en los TS.
- ✓ Mejoró la proliferación y normalizó la diferenciación neuronal hipocampal en los ratones TS.

9. Mejoró el **balance excitación-inhibición y la plasticidad sináptica hipocampal** ya que:

- ✓ Aunque no tuvo ningún efecto sobre la densidad de sinapsis inhibitorias, aumentó la densidad de sinapsis glutamatérgicas, disminuyendo el exceso de inhibición cerebral en estos animales.

Conclusiones

- ✓ Normalizó la LTP hipocampal en los ratones TS.

10. Redujo el progreso de diversos **procesos neurodegenerativos asociados al envejecimiento** normal del cerebro que están acentuados en el ratón TS:

- ✓ Disminuyó la neurodegeneración de neuronas colinérgicas en el septo medial de los ratones TS.
- ✓ Produjo una ligera disminución de los niveles de expresión de la proteína APP en la corteza de los animales TS, pero no modificó su expresión en el hipocampo.
- ✓ No redujo los niveles de A β 40 y A β 42 en los animales TS ni del péptido A β 42 en los animales CO. Sin embargo, disminuyó de forma significativa los acúmulos del péptido A β 40 en la corteza del grupo CO.
- ✓ Redujo los niveles de peroxidación lipídica en la corteza de los animales CO. Además, en el hipocampo redujo las diferencias existentes entre los ratones TS tratados con esta indolamina y el grupo CO tratado con vehículo.

El tratamiento crónico con melatonina durante las etapas pre- y post-natales:

1. No mejoró la cognición de los animales TS ya que no afectó a la memoria de referencia, de trabajo o de procedimiento en el MWM ni tampoco a la memoria acústica o a la contextual durante la prueba del CFC.

2. No disminuyó la hiperactividad frente a ambientes novedosos o situaciones aversivas de los animales TS en los diferentes paradigmas experimentales. Sin embargo, redujo la actividad exploratoria en ambos genotipos.

3. No modificó la atención de los animales.

4. No produjo ningún efecto sobre las habilidades sensoriales y/o motoras analizadas.

5. No alteró la actividad espontánea de los animales a lo largo del ciclo de 24 horas.

Bibliografía

- Acuña, M., Pérez-Nuñez, R., Noriega, J., Cárdenas, A.M., Bacigalupo, J., Delgado, R., Arriagada, C., Segura-Aguilar, J., Caviedes, R., Caviedes, P. (2012). Altered voltage dependent calcium currents in a neuronal cell line derived from the cerebral cortex of a trisomy 16 fetal mouse, an animal model of Down syndrome. *Neurotox Res* 22, 59-68.
- Acuña-Castroviejo, D., López, L.C., Escames, G., López, A., García, J.A., Reiter, R.J. (2011). Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem* 11, 221-240.
- Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M.E., Lima-Cabello, E., López, L.C., Rosales-Corral, S., Tan, D.X., Reiter, R.J. (2014). Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci* 71, 2997-3025.
- Ahn, K. J., H. K. Jeong, H. S. Choi, S. R. Ryoo, Y. J. Kim, J. S. Goo, S. Y. Choi, J. S. Han, I. Ha, and Song, W.J.(2006). DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects. *Neurobiol Dis* 22, 463-72.
- Aldridge, K., Reeves, R.H., Olson, L.E., and Richtsmeier, J.T. (2007). Differential effects of trisomy on brain shape and volume in related aneuploid mouse models. *Am J Med Genet A* 143A, 1060-1070.
- Altafaj, X., M. Dierssen, C. Baamonde, E. Marti, J. Visa, J. Guimera, M. Oset, J. R. Gonzalez, J. Florez, C. Fillat, and Estivill, X. (2001). Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum Mol Genet* 10, 1915-1923.
- Altafaj, X., Martín, E.D., Ortiz-Abalia, J., Valderrama, A., Lao-Peregrín, C., Dierssen, M., and Fillat, C. (2013). Normalization of Dyrk1A expression by AAV2/1-shDyrk1A attenuates hippocampal-dependent defects in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neurobiol Dis* 52, 117-127.
- Alvarez-García, V., González, A., Alonso-González, C., Martínez-Campa, C., Cos, S. (2012). Melatonin interferes in the desmoplastic reaction in breast cancer by regulating cytokine production. *J Pineal Res* 52, 282-290.
- Alvarez-García, V., González, A., Alonso-González, C., Martínez-Campa, C., Cos, S. (2013). Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. *J Pineal Res* 54, 373-380.
- Anagnostaras, S.G., Gale, G.D., and Fanselow, M.S. (2001). Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* 11, 8-17.
- Anderson, A.J., Stoltzner, S., Lai, F., Su, J., and Nixon, R.A. (2000). Morphological and biochemical assessment of DNA damage and apoptosis in Down syndrome and Alzheimer disease, and effect of postmortem tissue archival on TUNEL. *Neurobiol Aging* 21, 511-524.

Bibliografia

- Ani, C., Grantham-McGregor, S., Muller, D. (2000). Nutritional supplementation in Down syndrome: theoretical considerations and current status. *Dev Med Child Neurol* 42, 207-213.
- Antonarakis, S.E., and Epstein, C.J. (2006). The challenge of Down syndrome. *Trends Mol Med* 12, 473-479.
- Antonarakis, S.E., Lyle, R., Dermitzakis, E.T., Reymond, A., and Deutsch, S. (2004). Chromosome 21 and Down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet* 5, 725-738.
- Arakawa, M., Uchida, N., Kanda, N., Kurosawa, Y., Odani, T., Kanmatsuse, K., Endo, M., Yamazaki, T., Hidaka, S. (2014). Influence of losartan intake on the circadian rhythm of melatonin secretion in humans. *Pharmazie* 69, 192-197.
- Arendt, J. (1986). Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol* 8, 266-320.
- Arendt, J., Deacon, S., English, J., Hampton, S., Morgan, L. (1995). Melatonin and adjustment to phase shift. *J Sleep Res* 4, 74-79.
- Armstrong, R.A. (2013). What causes alzheimer's disease? *Folia Neuropathol* 51, 169-188.
- Asuni, A.A., Guridi, M., Pankiewicz, J.E., Sanchez, S., Sadowski, M.J. (2014). Modulation of amyloid precursor protein expression reduces β -amyloid deposition in a mouse model. *Ann Neurol* 75, 684-699.
- Atkinson, G., Holder, A., Robertson, C., Gant, N., Drust, B., Reilly, T., Waterhouse, J. (2005). Effects of melatonin on the thermoregulatory responses to intermittent exercise. *J Pineal Res* 39, 353-359.
- Aubrecht, T.G, Weil, Z.M., Nelson, R.J. (2014). Melatonin treatment during early life interacts with restraint to alter neuronal morphology and provoke depressive-like responses. *Behav Brain Res* 263, 90-97.
- 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. *Arch Neurol* 54, 209-212.
- Azizeh, B.Y., Head, E., Ibrahim, M.A., Torp, R., Tenner, A.J., Kim, R.C., Lott, I.T., Cotman, C.W. (2000). Molecular dating of senile plaques in the brains of individuals with Down syndrome and in aged dogs. *Exp Neurol* 163, 111-122.
- Baddeley, A., Jarrold, C. (2007). Working memory and Down syndrome. *J Intellect Disabil Res* 51, 925-931.
- Bahn, S., Mimmack, M., Ryan, M., Caldwell, M.A., Jauniaux, E., Starkey, M., Svendsen, C.N., and 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* 359, 310-315.
- Baka, M., Uyanikgil, Y., Ateş, U., Kültürsay, N. (2010). Investigation of maternal melatonin effect on the hippocampal formation of newborn rat model of intrauterine cortical dysplasia. *Childs Nerv Syst* 26, 1575-1581.
- Ball, S.L., Holland, A.J., Treppner, P., Watson, P.C., Huppert, F.A. (2008). Executive dysfunction and its association with personality and behaviour changes in the development of Alzheimer's disease in adults with Down syndrome and mild to moderate learning disabilities. *Br J Clin Psychol* 47, 1-29.
- Bambrick, L.L., Yarowsky, P.J., Krueger, B.K. (2003). Altered astrocyte calcium homeostasis and proliferation in the Ts65Dn mouse, a model of Down syndrome. *J Neurosci Res* 73, 89-94.
- Bambrick, L.L., Fiskum, G. Mitochondrial dysfunction in mouse trisomy 16 brain. (2008). *Brain Res* 1188, 9-16.
- Bar-Peled, O., Gross-Isseroff, R., Ben-Hur, H., Hoskins, I., Groner, Y., and Biegon, A. (1991). Fetal human brain exhibits a prenatal peak in the density of serotonin 5-HT_{1A} receptors. *Neurosci Lett.* 12, 173-6.
- Barlow-Walden, L.R., Reiter, R.J., Abe, M., Pablos, M., Menendez-Pelaez, A., Chen, L.D., Poeggeler, B. (1995). Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 26, 497-502.
- Bartesaghi, R., Guidi, S., and Ciani, E. (2011). Is it possible to improve neurodevelopmental abnormalities in Down syndrome? *Rev Neurosci* 22, 419-455.
- Bartus, R.T. (2000). On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol* 163, 495-529.
- Baxter, M.G., and Chiba, A.A. (1999). Cognitive functions of the basal forebrain. *Curr Opin Neurobiol* 9, 178-183.
- Baxter, L.L., Moran, T.H., Richtsmeier, J.T., Troncoso, J., and Reeves, R.H. (2000). Discovery and genetic localization of Down syndrome cerebellar phenotypes using the Ts65Dn mouse. *Hum Mol Genet* 9, 195-202.
- Baydas, G., Tuzcu, M. (2005). Protective effects of melatonin against ethanol-induced reactive gliosis in hippocampus and cortex of young and aged rats. *Exp Neurol* 194, 175-181.

Bibliografía

- 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. *Psychol Med* 39, 675-684.
- 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. *Psychol Med* 40, 611-619.
- Becker, L.E., Armstrong, D.L., and Chan, F. (1986). Dendritic atrophy in children with Down's syndrome. *Ann Neurol* 20, 520-526.
- Becker-André, M., Wiesenberg, I., Schaeren-Wiemers, N., André, E., Missbach, M., Saurat, J.H., Carlberg, C. (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 269, 28531-28534.
- Beřer, Ę.V., Khazhbiev, A.A., Arushanian, Ę.B. (2013). The optimizing influence of melatonin on the behavioral activity of cognitive enhancers. *Eksp Klin Farmakol* 76, 3-5.
- Belacchi, C., Passolunghi, M.C., Brentan, E., Dante, A., Persi, L., Cornoldi, C. (2014). Approximate additions and working memory in individuals with Down syndrome. *Res Dev Disabil* 35, 1027-1035.
- Belichenko, P.V., Masliah, E., Kleschevnikov, A.M., Villar, A.J., Epstein, C.J., Salehi, A., and Mobley, W.C. (2004). Synaptic structural abnormalities in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *J Comp Neurol* 480, 281-298.
- Belichenko, P.V., Kleschevnikov, A.M., Salehi, A., Epstein, C.J., and Mobley, W.C. (2007). Synaptic and cognitive abnormalities in mouse models of Down syndrome: exploring genotype-phenotype relationships. *J Comp Neurol* 504, 329-345.
- Belichenko, N.P., Belichenko, P.V., Kleschevnikov, A.M., Salehi, A., Reeves, R.H., and Mobley, W.C. (2009a). The "Down syndrome critical region" is sufficient in the mouse model to confer behavioral, neurophysiological, and synaptic phenotypes characteristic of Down syndrome. *J Neurosci* 29, 5938-5948.
- Belichenko, P.V., Kleschevnikov, A.M., Masliah, E., Wu, C., Takimoto-Kimura, R., Salehi, A., and Mobley, W.C. (2009b). Excitatory-inhibitory relationship in the fascia dentata in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *J Comp Neurol* 512, 453-466.
- Bellon, A., Ortíz-López, L., Ramírez-Rodríguez, G., Antón-Tay, F., Benítez-King, G. (2007). Melatonin induces neuritogenesis at early stages in N1E-115 cells through actin rearrangements via activation of protein kinase C and Rho-associated kinase. *J Pineal Res* 42, 214-221.

- Berger-Sweeney, J. (2003). The cholinergic basal forebrain system during development and its influence on cognitive processes: important questions and potential answers. *Neurosci Biobehav Rev* 27, 401-411.
- Bhattacharyya, A., McMillan, E., Chen, S.I., Wallace, K., and Svendsen, C.N. (2009). A critical period in cortical interneuron neurogenesis in Down syndrome revealed by human neural progenitor cells. *Dev Neurosci* 31, 497-510.
- Bianchi, P., Ciani, E., Contestabile, A., Guidi, S., and Bartesaghi, R. (2010a). Lithium restores neurogenesis in the subventricular zone of the Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome. *Brain Pathol* 20, 106-118.
- Bianchi, P., Ciani, E., Guidi, S., Trazzi, S., Felice, D., Grossi, G., Fernandez, M., Giuliani, A., Calzà, L., and Bartesaghi, R. (2010b). Early pharmacotherapy restores neurogenesis and cognitive performance in the Ts65Dn mouse model for Down syndrome. *J Neurosci* 30, 8769-8779.
- Biedenkapp, J.C., and Rudy, J.W. (2009). Hippocampal and extrahippocampal systems compete for control of contextual fear: role of ventral subiculum and amygdala. *Learn Mem* 16, 38-45.
- Bimonte-Nelson, H.A., Hunter, C.L., Nelson, M.E., and Granholm, A.C. (2003). Frontal cortex BDNF levels correlate with working memory in an animal model of Down syndrome. *Behav Brain Res* 139, 47-57.
- Biran, V., Phan Duy, A., Decobert, F., Bednarek, N., Alberti, C., Baud, O. (2014). Is melatonin ready to be used in preterm infants as a neuroprotectant? *Dev Med Child Neurol* 56, 717-723.
- Bojkowski, C.J., Arendt, J. (1990). Factors influencing urinary 6-sulphatoxymelatonin, a major melatonin metabolite, in normal human subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)* 33, 435-444.
- Bowes, C., Li, T., Frankel, W.N., Danciger, M., Coffin, J.M., Applebury, M.L., and Farber, D.B. (1993). Localization of a retroviral element within the rd gene coding for the beta subunit of cGMP phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2955-2959.
- Braudeau, J., Dauphinot, L., Duchon, A., Loistron, A., Dodd, R.H., Héroult, Y., Delatour, B., and Potier, M.C. (2011a). Chronic Treatment with a Promnesiant GABA-A $\alpha 5$ -Selective Inverse Agonist Increases Immediate Early Genes Expression during Memory Processing in Mice and Rectifies Their Expression Levels in a Down Syndrome Mouse Model. *Adv Pharmacol Sci* 2011, 153218.
- Braudeau, J., Delatour, B., Duchon, A., Pereira, P.L., Dauphinot, L., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.C., Dodd, R.H., Héroult, Y., and Potier, M.C. (2011b). Specific targeting of the GABA-A receptor $\alpha 5$ subtype by a selective inverse agonist restores cognitive deficits in Down syndrome mice. *J Psychopharmacol* 25, 1030-1042.

Bibliografía

- Brooks, E., Patel, D., Canal, M.M. (2014). Programming of mice circadian photic responses by postnatal light environment. *PLoS One* 9, e97160.
- Brugge, K., Nichols, S., Saitoh, T., Trauner, D. (1999). Correlations of glutathione peroxidase activity with memory impairment in adults with Down syndrome. *Biol Psychiatry* 46, 1682-1689.
- Brusco, L.I., Fainstein, I., Márquez, M., Cardinali, D.P. (1999). Effect of melatonin in selected populations of sleep-disturbed patients. *Biol Signals Recept* 8, 126-131.
- Brzezinski, A. (1997). Melatonin in humans 336, 186-195.
- Busciglio, J., Yankner, B.A. (1995). Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons *in vitro*. *Nature* 378, 776-779.
- 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. *Curr Pharm Des* 13, 1091-1098.
- Bussy, G., Charrin, E., Brun, A., Curie, A., des Portes, V. (2011). Implicit procedural learning in fragile X and Down syndrome. *J Intellect Disabil Res* 55, 521-528.
- Campenot, R.B., and MacInnis, B.L. (2004). Retrograde transport of neurotrophins: fact and function. *J Neurobiol* 58, 217-229.
- Cao, X.J., Wang, M., Chen, W.H., Zhu, D.M., She, J.Q., Ruan, D.Y. (2009). Effects of chronic administration of melatonin on spatial learning ability and long-term potentiation in lead-exposed and control rats. *Biomed Environ Sci* 22, 70-75.
- Cardinali, D.P., Furio, A.M., Brusco, L.I. (2010). Clinical aspects of melatonin intervention in Alzheimer's disease progression. *Curr Neuropharmacol* 8, 218-227.
- Carlesimo, G.A., Marotta, L., Vicari, S. (1997). Long-term memory in mental retardation: evidence for a specific impairment in subjects with Down's syndrome. *Neuropsychologia* 35, 71-79.
- Carr, R., Wasdell, M.B., Hamilton, D., Weiss, M.D., Freeman, R.D., Tai, J., Rietveld, W.J., Jan, J.E. (2007). Long-term effectiveness outcome of melatonin therapy in children with treatment-resistant circadian rhythm sleep disorders. *J Pineal Res* 43, 351-359.
- Carr, J., Collins, S. (2014). Ageing and dementia in a longitudinal study of a cohort with Down syndrome. *J Appl Res Intellect Disabil* 27, 555-563.
- Carson, V.B. (2013). Alzheimer's in those with Down's syndrome. *Caring* 32, 52-53.

- 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. *Am J Pathol* 173, 370-384.
- 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. *Biochim Biophys Acta* 1822, 130-138.
- Chakrabarti, L., Galdzicki, Z., and Haydar, T.F. (2007). Defects in embryonic neurogenesis and initial synapse formation in the forebrain of the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *J Neurosci* 27, 11483-11495.
- 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. *Nat Neurosci* 13, 927-934.
- Chang, H.M., Huang, Y.L., Lan, C.T., Wu, U.I., Hu, M.E., Youn, S.C. (2008). Melatonin preserves superoxide dismutase activity in hypoglossal motoneurons of adult rats following peripheral nerve injury. *J Pineal Res* 44, 172-180.
- Chao, M.V., Rajagopal, R., and Lee, F.S. (2006). Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci (Lond)* 110, 167-173.
- 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. *J Speech Lang Hear Res* 43, 340-350.
- Chapman, R.S. (2006). Language learning in Down syndrome: the speech and language profile compared to adolescents with cognitive impairment of unknown origin. *Downs Syndr Res Pract* 10, 61-66.
- Chen, Y.C., Sheen, J.M., Tain, Y.L., Chen, C.C., Tiao, M.M., Huang, Y.H., Hsieh, C.S., Huang, L.T. (2012). Alterations in NADPH oxidase expression and blood-brain barrier in bile duct ligation-treated young rats: effects of melatonin. *Neurochem Int* 60, 751-758.
- 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. *Mol Cell* 52, 87-100.
- Clark, S., Schwalbe, J., Stasko, M.R., Yarowsky, P.J., and Costa, A.C. (2006). Fluoxetine rescues deficient neurogenesis in hippocampus of the Ts65Dn mouse model for Down syndrome. *Exp Neurol* 200, 256-261.

Bibliografía

- Colmenero, M.D., Díaz, B., Miguel, J.L., González, M.L., Esquifino, A., Marín, B. (1991). Melatonin administration during pregnancy retards sexual maturation of female offspring in the rat. *J Pineal Res* *11*, 23-27.
- Contestabile, A., Fila, T., Ceccarelli, C., Bonasoni, P., Bonapace, L., Santini, D., Bartesaghi, R., and Ciani, E. (2007). Cell cycle alteration and decreased cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus and in the neocortical germinal matrix of fetuses with Down syndrome and in Ts65Dn mice. *Hippocampus* *17*, 665-678.
- Contestabile, A., and Ciani, E. (2008). The place of choline acetyltransferase activity measurement in the "cholinergic hypothesis" of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res* *33*, 318-327.
- Contestabile, A., Fila, T., Bartesaghi, R., and Ciani, E. (2009a). Cell cycle elongation impairs proliferation of cerebellar granule cell precursors in the Ts65Dn mouse, an animal model for Down syndrome. *Brain Pathol* *19*, 224-237.
- Contestabile, A., Fila, T., Cappellini, A., Bartesaghi, R., and Ciani, E. (2009b). Widespread impairment of cell proliferation in the neonate Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome. *Cell Prolif* *42*, 171-181.
- Contestabile, A., Greco, B., Ghezzi, D., Tucci, V., Benfenati, F., Gasparini, L. (2013). Lithium rescues synaptic plasticity and memory in Down syndrome mice. *J Clin Invest* *123*, 348-361.
- 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., and 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 10439-10444.
- Costa, A. C., Walsh, K., and Davisson, M.T.(1999). Motor dysfunction in a mouse model for Down syndrome. *Physiol Behav* *68*,211-20.
- Costa, A.C., and Grybko, M.J. (2005). Deficits in hippocampal CA1 LTP induced by TBS but not HFS in the Ts65Dn mouse: a model of Down syndrome. *Neurosci Lett* *382*, 317-322.
- Coussons-Read, M.E., and Crnic, L.S. (1996). Behavioral assessment of the Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome: altered behavior in the elevated plus maze and open field. *Behav Genet* *26*, 7-13.
- Coyle, J.T., Oster-Granite, M.L., and Gearhart, J.D. (1986). The neurobiologic consequences of Down syndrome. *Brain Res Bull* *16*, 773-787.
- Cramer, N., Galdzicki, Z. (2012). From abnormal hippocampal synaptic plasticity in down syndrome mouse models to cognitive disability in down syndrome. *Neural Plast* 2012:101542.

- Crníc, L.S., and Pennington, B.F. (2000). Down síndrome: neurophysiology and animal models. In *Progress in Infancy Research*, pp. 69-111.
- Crupi, R., Mazzon, E., Marino, A., La Spada, G., Bramanti, P., Spina, E., Cuzzocrea, S. (2011). Melatonin's stimulatory effect on adult hippocampal neurogenesis in mice persists after ovariectomy. *J Pineal Res* 51, 353-360.
- Dang, V., Medina, B., Das, D., Moghadam, S., Martin, K.J., Lin, B., Naik, P., Patel, D., Nosheny, R., Wesson Ashford, J., Salehi, A. Formoterol, a long-acting β_2 adrenergic agonist, improves cognitive function and promotes dendritic complexity in a mouse model of Down syndrome. *Biol Psychiatry* 75, 179-188.
- Das, A., McDowell, M., Pava, M.J., Smith, J.A., Reiter, R.J., Woodward, J.J., Varma, A.K., Ray, S.K., Banik, N.L. (2010). The inhibition of apoptosis by melatonin in VSC4.1 motoneurons exposed to oxidative stress, glutamate excitotoxicity, or TNF-alpha toxicity involves membrane melatonin receptors. *J Pineal Res* 48, 157-169.
- Das, I., Reeves, R.H. (2011). The use of mouse models to understand and improve cognitive deficits in Down syndrome. *Dis Model Mech* 4, 596-606.
- Das, I., Park, J.M., Shin, J.H., Jeon, S.K., Lorenzi, H., Linden, D.J., Worley, P.F., and Reeves, R.H. (2013). Hedgehog agonist therapy corrects structural and cognitive deficits in a Down syndrome mouse model. *Sci Transl Med* 5, 201ra120.
- Davisson, M.T., Schmidt, C., and Akeson, E.C. (1990). Segmental trisomy of murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* 360, 263-280.
- Deb, S., Hare, M., Prior, L. (2007). Symptoms of dementia among adults with Down's syndrome: a qualitative study. *J Intellect Disabil Res* 51, 726-739.
- Decker, J.F., Quay, W.B. (1982). Stimulatory effects of melatonin on ependymal epithelium of choroid plexuses in golden hamsters. *J Neural Transm* 55, 53-67.
- Delabar, J.M., Theophile, D., Rahmani, Z., Chettouh, Z., Blouin, J.L., Prieur, M., Noel, B., and Sinet, P.M. (1993). Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 1, 114-124.
- Delibas, N., Altuntas, I., Yonden, Z., Ozcelik, N. (2003). Ochratoxin A reduces NMDA receptor subunits 2A and 2B concentrations in rat hippocampus: partial protective effect of melatonin. *Hum Exp Toxicol* 22, 335-339.
- Demas, G.E., Nelson, R.J., Krueger, B.K., and Yarowsky, P.J. (1996). Spatial memory deficits in segmental trisomic Ts65Dn mice. *Behav Brain Res* 82, 85-92.

Bibliografía

- Deng, W., Saxe, M.D., Gallina, I.S., Gage, F.H. (2009). Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain. *J Neurosci* 29, 13532-13542.
- Devinsky, O., Sato, S., Conwit, R.A., and Schapiro, M.B. (1990). Relation of EEG alpha background to cognitive function, brain atrophy, and cerebral metabolism in Down's syndrome. Age-specific changes. *Arch Neurol* 47, 58-62.
- Di Domenico, F., Coccia, R., Cocciolo, A., Murphy, M.P., Cenini, G., Head, E., Butterfield, D.A., Giorgi, A., Schinina, M.E., Mancuso, C., Cini, C., Perluigi, M. (2013). Impairment of proteostasis network in Down syndrome prior to the development of Alzheimer's disease neuropathology: redox proteomics analysis of human brain. *Biochim Biophys Acta* 1832, 1249-1259.
- Díaz López, B., Colmenero Urquijo, M.D., Marín Fernández, B. (1998). The antioxidant capacity of melatonin: its defensive role against age-related diseases. *Med Clin (Barc)* 110, 668-676.
- Díaz Rodríguez, E., Díaz López, B., Debeljuk, L., Esquifino Parras, A.I., Arce Fraguas, A., Marín Fernández, B. (1999). Developmental changes of hypothalamic, pituitary and striatal tachykinins in response to testosterone: influence of prenatal melatonin. *Peptides* 20, 501-508.
- Dickson, P.E., Rogers, T.D., Del Mar, N., Martin, L.A., Heck, D., Blaha, C.D., Goldowitz, D., and Mittleman, G. (2010). Behavioral flexibility in a mouse model of developmental cerebellar Purkinje cell loss. *Neurobiol Learn Mem* 94, 220-228.
- Dierssen, M., Vallina, I.F., Baamonde, C., García-Calatayud, S., Lumbreras, M.A., and Flórez, J. (1997). Alterations of central noradrenergic transmission in Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome. *Brain Res* 749, 238-244.
- Dierssen, M., Benavides-Piccione, R., Martínez-Cué, C., Estivill, X., Flórez, J., Elston, G.N., and DeFelipe, J. (2003). Alterations of neocortical pyramidal cell phenotype in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: effects of environmental enrichment. *Cereb Cortex* 13, 758-764.
- Dierssen, M., and de Lagrán, M.M. (2006). DYRK1A (dual-specificity tyrosine-phosphorylated and -regulated kinase 1A): a gene with dosage effect during development and neurogenesis. *ScientificWorld Journal* 6, 1911-1922.
- Dierssen, M., Hérault, Y., and Estivill, X. (2009). Aneuploidy: from a physiological mechanism of variance to Down syndrome. *Physiol Rev* 89, 887-920.
- Dierssen, M. (2012). Down syndrome: the brain in trisomic mode. *Nat Rev Neurosci* 13, 844-858.

- 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. *Toxicol In Vitro* 24, 815-821.
- Domínguez-Alonso, A., Ramírez-Rodríguez, G., Benítez-King, G. (2012). Melatonin increases dendritogenesis in the hilus of hippocampal organotypic cultures. *J Pineal Res* 52, 427-436.
- Dominguez-Rodriguez, A., Abreu-Gonzalez, P., Avanzas, P. (2012). The role of melatonin in acute myocardial infarction. *Front Biosci* 17, 2433-2441.
- Dowdy-Sanders, N.C., Wenger, G.R. (2006). Working memory in the Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome. *Behav Brain Res* 168, 349-352.
- Dragicevic, N., Copes, N., O'Neal-Moffitt, G., Jin, J., Buzzeo, R., Mamcarz, M., Tan, J., Cao, C., Olcese, J.M., Arendash, G.W., Bradshaw, P.C. (2011). Melatonin treatment restores mitochondrial function in Alzheimer's mice: a mitochondrial protective role of melatonin membrane receptor signaling. *J Pineal Res* 51, 75-86.
- Driscoll, L.L., Carroll, J.C., Moon, J., Crnic, L.S., Levitsky, D.A., and 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. *Behav Neurosci* 118, 1196-1205.
- Duchon, A., Pothion, S., Brault, V., Sharp, A.J., Tybulewicz, V.L., Fisher, E.M., Herault, Y. (2010). The telomeric part of the human chromosome 21 from Cstb to Prmt2 is not necessary for the locomotor and short-term memory deficits observed in the Tc1 mouse model of Down syndrome. *Behav Brain Res* 217, 271-281.
- Duchon, A., Raveau, M., Chevalier, C., Nalesso, V., Sharp, A.J., and Herault, Y. (2011). Identification of the translocation breakpoints in the Ts65Dn and Ts1Cje mouse lines: relevance for modeling Down syndrome. *Mamm Genome* 22, 674-684.
- Dupret, D., Revest, J.M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D.N., Piazza, P.V. (2008). Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One* 3, e1959.
- Elton, T.S., Sansom, S.E., and Martin, M.M. (2010). Trisomy-21 gene dosage over-expression of miRNAs results in the haploinsufficiency of specific target proteins. *RNA Biol* 7, 540-547.
- Engidawork, E., and Lubec, G. (2003). Molecular changes in fetal Down syndrome brain. *J Neurochem* 84, 895-904.
- Escorihuela, R.M., Fernández-Teruel, A., Vallina, I.F., Baamonde, C., Lumbreras, M.A., Dierssen, M., Tobeña, A., and Flórez, J. (1995). A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. *Neurosci Lett* 199, 143-146.

Bibliografía

- Escorihuela, R.M., Vallina, I.F., Martínez-Cué, C., Baamonde, C., Dierssen, M., Tobeña, A., Flórez, J., and Fernández-Teruel, A. (1998). Impaired short- and long-term memory in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Neurosci Lett* 247, 171-174.
- Esposito, G., Imitola, J., Lu, J., De Filippis, D., Scuderi, C., Ganesh, V.S., Folkerth, R., Hecht, J., Shin, S., Iuvone, T., *et al.* (2008). Genomic and functional profiling of human Down syndrome neural progenitors implicates S100B and aquaporin 4 in cell injury. *Hum Mol Genet* 17, 440-457.
- Feng, Z., Chang, Y., Cheng, Y., Zhang, B.L., Qu, Z.W., Qin, C., Zhang, J.T. (2004a). Melatonin alleviates behavioral deficits associated with apoptosis and cholinergic system dysfunction in the APP 695 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Pineal Res* 37, 129-136.
- Feng, Z., Cheng, Y., Zhang, J.T. (2004b). Long-term effects of melatonin or 17 beta-estradiol on improving spatial memory performance in cognitively impaired, ovariectomized adult rats. *J Pineal Res* 37, 198-206.
- Feng, Z., Qin, C., Chang, Y., Zhang, J.T. (2006). Early melatonin supplementation alleviates oxidative stress in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 40, 101-109.
- Fernandez, F., Morishita, W., Zuniga, E., Nguyen, J., Blank, M., Malenka, R.C., and Garner, C.C. (2007). Pharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of Down syndrome. *Nat Neurosci* 10, 411-413.
- Fernandez, F., Trinidad, J.C., Blank, M., Feng, D.D., Burlingame, A.L., and Garner, C.C. (2009). Normal protein composition of synapses in Ts65Dn mice: a mouse model of Down syndrome. *J Neurochem* 110, 157-169.
- 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* 4, 828-841.
- Ferrer, I., and Gullotta, F. (1990). Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus. *Acta Neuropathol* 79, 680-685.
- Fillat, C., M. Dierssen, M. M. de Lagrán, and Altafaj, X. (2010). Insights from mouse models to understand neurodegeneration in Down syndrome. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9, 429-38.
- Flórez, J. (1999). Patología cerebral y sus repercusiones cognitivas en el síndrome de Down. *Siglo Cero* 30, 29-45.

- Florian, C., Roulet, P. (2004). Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behav Brain Res* 154, 365-374.
- 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* 358, 201-205.
- Fukuda, Y., Berry, T.L., Nelson, M., Hunter, C.L., Fukuhara, K., Imai, H., Ito, S., Granholm-Bentley, A.C., Kaplan, A.P., and Mutoh, T. (2010). Stimulated neuronal expression of brain-derived neurotrophic factor by Neurotrophin. *Mol Cell Neurosci* 45, 226-233.
- 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. *Am J Pathol* 146, 357-367.
- Galano, A., Tan, D.X., Reiter, R.J. (2011). Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res* 51, 1-16.
- Galano, A., Tan, D.X., Reiter, R.J. (2013). On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J Pineal Res* 54, 245-257.
- 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 Res Brain Res Rev* 35, 115-145.
- Galeote, M., Soto, P., Sebastián, E., Checa, E., Sánchez-Palacios, C. (2014). Early grammatical development in Spanish children with Down syndrome. *J Child Lang* 41, 111-131.
- 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. *Behav Brain Res* 109, 37-47.
- Gandolfi, A., Horoupian, D.S., and De Teresa, R.M. (1981). Pathology of the auditory system in autosomal trisomies with morphometric and quantitative study of the ventral cochlear nucleus. *J Neurol Sci* 51, 43-50.
- García, T., Ribes, D., Colomina, M.T., Cabré, M., Domingo, J.L., Gómez, M. (2009). Evaluation of the protective role of melatonin on the behavioral effects of aluminum in a mouse model of Alzheimer's disease. *Toxicology* 265, 49-55.
- García-Cerro, S., Martínez, P., Vidal, V., Corrales, A., Flórez, J., Vidal, R., Rueda, N., Arbonés, M.L., Martínez-Cué, C. (2014). Overexpression of Dyrk1A is implicated in several cognitive, electrophysiological and neuromorphological alterations found in a mouse model of Down syndrome. *PLoS One* 9: e106572.

Bibliografía

- García-Mesa, Y., Giménez-Llort, L., López, L.C., Venegas, C., Cristòfol, R., Escames, G., Acuña-Castroviejo, D., Sanfeliu, C. (2012). Melatonin plus physical exercise are highly neuroprotective in the 3xTg-AD mouse. *Neurobiol Aging* 33, e13-29.
- Gardiner, K. (2004). Gene-dosage effects in Down syndrome and trisomic mouse models. *Genome Biol* 5, 244.
- Gitto, E., Tan, D.X., Reiter, R.J., Karbownik, M., Manchester, L.C., Cuzzocrea, S., Fulia, F., Barberi, I. (2001). Individual and synergistic antioxidative actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferrioxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates. *J Pharm Pharmacol* 53, 1393-1401.
- Gitto, E., Aversa, S., Salpietro, C.D., Barberi, I., Arrigo, T., Trimarchi, G., Reiter, R.J., Pellegrino, S. (2012). Pain in neonatal intensive care: role of melatonin as an analgesic antioxidant. *J Pineal Res* 52, 291-295.
- Godridge, H., Reynolds, G.P., Czudek, C., Calcutt, N.A., and Benton, M. (1987). Alzheimer-like neurotransmitter deficits in adult Down's syndrome brain tissue. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50, 775-778.
- Golden, J.A., and Hyman, B.T. (1994). Development of the superior temporal neocortex is anomalous in trisomy 21. *J Neuropathol Exp Neurol* 53, 513-520.
- Goosens, K.A., and Maren, S. (2001). Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. *Learn Mem* 8, 148-155.
- Gotti, S., Caricati, E., and Panzica, G. (2011). Alterations of brain circuits in Down syndrome murine models. *J Chem Neuroanat* 42, 317-326.
- Granhölm, A.C., Sanders, L.A., and Crnic, L.S. (2000). Loss of cholinergic phenotype in basal forebrain coincides with cognitive decline in a mouse model of Down's syndrome. *Exp Neurol* 161, 647-663.
- Griffin, W.S., Stanley, L.C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L.J., White, C.L., and Araoz, C. (1989). Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7611-7615.
- Gropp, A., Kolbus, U., and Giers, D. (1975). Systematic approach to the study of trisomy in the mouse. II. *Cytogenet Cell Genet* 14, 42-62.
- Grothe, M.J., Schuster, C., Bauer, F., Heinsen, H., Prudlo, J., Teipel, S.J. (2014). Atrophy of the cholinergic basal forebrain in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease dementia. *J Neurol* 261, 1939-1948.

- Guedj, F., Sébrié, C., Rivals, I., Ledru, A., Paly, E., Bizot, J.C., Smith, D., Rubin, E., Gillet, B., Arbones, M., *et al.* (2009). Green tea polyphenols rescue of brain defects induced by overexpression of DYRK1A. *PLoS One* 4, e4606.
- Guermonprez, L., Ducrocq, C., Gaudry-Talarmain, Y.M. (2001). Inhibition of acetylcholine synthesis and tyrosine nitration induced by peroxynitrite are differentially prevented by antioxidants. *Mol Pharmacol* 60, 838-846.
- Guidi, S., Bonasoni, P., Ceccarelli, C., Santini, D., Gualtieri, F., Ciani, E., and Bartesaghi, R. (2008). Neurogenesis impairment and increased cell death reduce total neuron number in the hippocampal region of fetuses with Down syndrome. *Brain Pathol* 18, 180-197.
- 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 Pathol* 21, 361-373.
- Guihard-Costa, A.M., Khung, S., Delbecque, K., Ménez, F., and Delezoide, A.L. (2006). Biometry of face and brain in fetuses with trisomy 21. *Pediatr Res* 59, 33-38.
- Gulesserian, T., Engidawork, E., Yoo, B.C., Cairns, N., and Lubec, G. (2001). Alteration of caspases and other apoptosis regulatory proteins in Down syndrome. *J Neural Transm Suppl*, 163-179.
- Guo, K.H., Li, D.P., Gu, H.Y., Jie-Xu, Yao, Z.B. (2014). Postnatal development of nestin positive neurons in rat basal forebrain: different onset and topography with choline acetyltransferase and parvalbumin expression. *Int J Dev Neurosci* 35, 72-79.
- Haas, M.A., Bell, D., Slender, A., Lana-Elola, E., Watson-Scales, S., Fisher, E.M., Tybulewicz, V.L., Guillemot, F. (2013). Alterations to dendritic spine morphology, but not dendrite patterning, of cortical projection neurons in Tc1 and Ts1Rhr mouse models of Down syndrome. *PLoS One* 8, 78561.
- Hanslmayr, S., Matuschek, J., Fellner, M.C. (2014). Entrainment of prefrontal beta oscillations induces an endogenous echo and impairs memory formation. *Curr Biol* 24, 904-909.
- 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. *J Physiol* 579, 53-67.
- Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T.D., Watanabe, H., Yada, T., Park, H.S., Toyoda, A., Ishii, K., Totoki, Y., Choi, D.K., *et al.* (2000). The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 405, 311-319.
- Head, E., Lott, I.T. (2004). Down syndrome and beta-amyloid deposition. *Curr Opin Neurol* 17, 95-100.

Bibliografía

- Helguera, P., Pelsman, A., Pigino, G., Wolvetang, E., Head, E., and Busciglio, J. (2005). Ets-2 promotes the activation of a mitochondrial death pathway in Down's syndrome neurons. *J Neurosci* 25, 2295-2303.
- 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., *et al.* (1996). Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13333-13338.
- Hong, Y., Palaksha, K.J., Park, K., Park, S., Kim, H.D., Reiter, R.J., Chang, K.T. (2010). Melatonin plus exercise-based neurorehabilitative therapy for spinal cord injury. *J Pineal Res* 49, 201-209.
- Hook, E.B. (1981). Unbalanced Robertsonian translocations associated with Down's syndrome or Patau's syndrome: chromosome subtype, proportion inherited, mutation rates, and sex ratio. *Hum Genet* 59, 235-239.
- Hunter, C.L., Bimonte, H.A., and Granholm, A.C. (2003). Behavioral comparison of 4 and 6 month-old Ts65Dn mice: age-related impairments in working and reference memory. *Behav Brain Res* 138, 121-131.
- Hunter, C.L., Bachman, D., and Granholm, A.C. (2004). Minocycline prevents cholinergic loss in a mouse model of Down's syndrome. *Ann Neurol* 56, 675-688.
- 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. *Behav Neurosci* 115, 1239-1246.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itohara, S., Kageyama, R. (2008). Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 11, 1153-1161.
- 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. *Mol Genet Metab* 102, 378-382.
- Insausti, A.M., Megías, M., Crespo, D., Cruz-Orive, L.M., Dierssen, M., Vallina, I.F., Insausti, R., Flórez, J., and Vallina, T.F. (1998). Hippocampal volume and neuronal number in Ts65Dn mice: a murine model of Down syndrome. *Neurosci Lett* 253, 175-178.
- Isacson, O., Seo, H., Lin, L., Albeck, D., and Granholm, A.C. (2002). Alzheimer's disease and Down's syndrome: roles of APP, trophic factors and ACh. *Trends Neurosci* 25, 79-84.
- Ishihara, K., Amano, K., Takaki, E., Shimohata, A., Sago, H., Epstein, C.J., Yamakawa, K. (2010). Enlarged brain ventricles and impaired neurogenesis in the Ts1Cje and Ts2Cje mouse models of Down syndrome. *Cereb Cortex* 20, 1131-1143.

- Ishihara, K., Kanai, S., Sago, H., Yamakawa, K., Akiba, S. (2014). Comparative proteomic profiling reveals aberrant cell proliferation in the brain of embryonic Ts1Cje, a mouse model of Down syndrome. *Neuroscience* 281, 1-15.
- Jahnke, G., Marr, M., Myers, C., Wilson, R., Travlos, G., Price, C. (1999). Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 50, 271-279.
- Jan, J.E., Wasdell, M.B., Freeman, R.D., Bax, M. (2007). Evidence supporting the use of melatonin in short gestation infants. *J Pineal Res* 42, 22-27.
- Jang, H., Arce, F.T., Ramachandran, S., Capone, R., Azimova, R., Kagan, B.L., Nussinov, R., Lal, R. (2010). Truncated beta-amyloid peptide channels provide an alternative mechanism for Alzheimer's Disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 6538-6543.
- 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. *Q J Exp Psychol (Hove)* 61, 324-340.
- Jeong, J.K., Moon, M.H., Lee, Y.J., Seol, J.W., Park, S.Y. (2012). Melatonin-induced autophagy protects against human prion protein-mediated neurotoxicity. *J Pineal Res* 53, 138-146.
- Jernigan, T.L., Bellugi, U., Sowell, E., Doherty, S., and Hesselink, J.R. (1993). Cerebral morphologic distinctions between Williams and Down syndromes. *Arch Neurol* 50, 186-191.
- Ji, L., Chauhan, V., Mehta, P., Wegiel, J., Mehta, S., Chauhan, A. (2010). Relationship between proteolytically cleaved gelsolin and levels of amyloid- β protein in the brains of Down syndrome subjects. *J Alzheimers Dis* 22, 609-617.
- Jiang, Y., Mullaney, K.A., Peterhoff, C.M., Che, S., Schmidt, S.D., Boyer-Boiteau, A., Ginsberg, S.D., Cataldo, A.M., Mathews, P.M., Nixon, R.A. (2010). Alzheimer's-related endosome dysfunction in Down syndrome is A β -independent but requires APP and is reversed by BACE-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1630-1635.
- Jou, M.J., Peng, T.I., Yu, P.Z., Jou, S.B., Reiter, R.J., Chen, J.Y., Wu, H.Y., Chen, C.C., Hsu, L.F. (2007). Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. *J Pineal Res* 43, 389-403.
- Jou, M.J., Peng, T.I., Hsu, L.F., Jou, S.B., Reiter, R.J., Yang, C.M., Chiao, C.C., Lin, Y.F., Chen, C.C. (2010). Visualization of melatonin's multiple mitochondrial levels of protection against mitochondrial Ca²⁺-mediated permeability transition and beyond in rat brain astrocytes. *J Pineal Res* 48, 20-38.
- Jovanovic, S.V., Clements, D., MacLeod, K. (1998). Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome. *Free Radic Biol Med* 25, 1044-1048.

Bibliografia

- Kaminker, P., Armando, R. (2008). Down syndrome: first part: clinical and genetic approach. *Arch Argent Pediatr* 106, 249-259.
- Karakaş, A., Coşkun, H., Kaya, A., Küçük, A., Gündüz, B. (2011). The effects of the intraamygdalar melatonin injections on the anxiety like behavior and the spatial memory performance in male Wistar rats. *Behav Brain Res* 222, 141-150.
- Karrer, J.H., Karrer, R., Bloom, D., Chaney, L., and Davis, R. (1998). Event-related brain potentials during an extended visual recognition memory task depict delayed development of cerebral inhibitory processes among 6-month-old infants with Down syndrome. *Int J Psychophysiol* 29, 167-200.
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., and Nakahara, H. (2003). Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci* 26, 360-368.
- Kaufmann, W.E., Moser, H.W. (2000). Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex* 10, 981-991.
- Kaur, G., Sharma, A., Xu, W., Gerum, S., Alldred, M.J., Subbanna, S., Basavarajappa, B.S., Pawlik, M., Ohno, M., Ginsberg, S.D., Wilson, D.A., Guilfoyle, D.N., Levy, E. (2014). Glutamatergic transmission aberration: a major cause of behavioral deficits in a murine model of Down's syndrome. *J Neurosci* 34, 5099-5106.
- Kesslak, J.P., Nagata, S.F., Lott, I., and Nalcioglu, O. (1994). Magnetic resonance imaging analysis of age-related changes in the brains of individuals with Down's syndrome. *Neurology* 44, 1039-1045.
- Kholodar-Smith, D.B., Allen, T.A., Brown, T.H. (2008). Fear conditioning to discontinuous auditory cues requires perirhinal cortical function. *Behav Neurosci* 122, 1178-1185.
- 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 Mol Life Sci* 57, 1810-1816.
- Kim, H.S., and Suh, Y.H. (2009). Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behav Brain Res* 196, 168-179.
- Kim, H.A., Lee, K.H., Lee, B.H. (2014). Neuroprotective effect of melatonin against kainic acid-induced oxidative injury in hippocampal slice culture of rats. *Int J Mol Sci* 15, 5940-5951.
- Kimura, R., Kamino, K., Yamamoto, M., Nuripa, A., Kida, T., Kazui, H., Hashimoto, R., Tanaka, T., Kudo, T., Yamagata, H., Tabara, Y., Miki, T., Akatsu, H., Kosaka, K., Funakoshi, E., Nishitomi, K., Sakaguchi, G., Kato, A., Hattori, H., Uema, T., Takeda, M. (2007). The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between beta-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Hum Mol Genet* 16, 15-23.

- King, M.G., Stinus, L., le Moal, M., Geffard, M. (1982). Central administration of arginine vasotocin: effects on exploratory behavior in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 76, 40-43.
- Kishnani, P.S., Sullivan, J.A., Walter, B.K., Spiridigliozzi, G.A., Doraiswamy, P.M., Krishnan, K.R. (1999). Cholinergic therapy for Down's syndrome. *Lancet* 353, 1064-1065.
- Klein, D.C. (1972). Evidence for the placental transfer of 3 H-acetyl-melatonin. *Nat New Biol* 237, 117-118.
- Kleschevnikov, A.M., Belichenko, P.V., Villar, A.J., Epstein, C.J., Malenka, R.C., and Mobley, W.C. (2004). Hippocampal long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome. *J Neurosci* 24, 8153-8160.
- Kleschevnikov, A.M., Belichenko, P.V., Faizi, M., Jacobs, L.F., Htun, K., Shamloo, M., and Mobley, W.C. (2012a). Deficits in cognition and synaptic plasticity in a mouse model of Down syndrome ameliorated by GABAB receptor antagonists. *J Neurosci* 32, 9217-9227.
- Kleschevnikov, A.M., Belichenko, P.V., Gall, J., George, L., Nosheny, R., Maloney, M.T., Salehi, A., and Mobley, W.C. (2012b). Increased efficiency of the GABAA and GABAB receptor-mediated neurotransmission in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neurobiol Dis* 45, 683-691.
- Kong, X., Li, X., Cai, Z., Yang, N., Liu, Y., Shu, J., Pan, L., Zuo, P. (2008). Melatonin regulates the viability and differentiation of rat midbrain neural stem cells. *Cell Mol Neurobiol* 28, 569-79.
- 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., *et al.* (2009). The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12031-12036.
- Korenberg, J.R., Kawashima, H., Pulst, S.M., Ikeuchi, T., Ogasawara, N., Yamamoto, K., Schonberg, S.A., West, R., Allen, L., and Magenis, E. (1990). Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. *Am J Hum Genet* 47, 236-246.
- Krasuski, J.S., Alexander, G.E., Horwitz, B., Rapoport, S.I., and 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. *Am J Psychiatry* 159, 74-81.
- Krinsky-McHale, S.J., Devenny, D.A., Kittler, P., Silverman, W. (2008). Selective attention deficits associated with mild cognitive impairment and early stage Alzheimer's disease in adults with Down syndrome. *Am J Ment Retard* 113, 369-386.

Bibliografia

- Kurabayashi, N., Sanada, K. (2013). Increased dosage of DYRK1A and DSCR1 delays neuronal differentiation in neocortical progenitor cells. *Genes Dev* 27, 2708-2721.
- Kurt, M.A., Kafa, M.I., Dierssen, M., and Davies, D.C. (2004). Deficits of neuronal density in CA1 and synaptic density in the dentate gyrus, CA3 and CA1, in a mouse model of Down syndrome. *Brain Res* 1022, 101-109.
- Lahiri, D.K. (1999). Melatonin affects the metabolism of the beta-amyloid precursor protein in different cell types. *J Pineal Res* 26, 137-146.
- Lanfranchi, S., Jerman, O., Dal Pont, E., Alberti, A., and Vianello, R. (2010). Executive function in adolescents with Down Syndrome. *J Intellect Disabil Res* 54, 308-319.
- Lanfranchi, S., Baddeley, A., Gathercole, S., and Vianello, R. (2012). Working memory in Down syndrome: is there a dual task deficit? *J Intellect Disabil Res* 56, 157-166.
- Larsen, K.B., Laursen, H., Graem, N., Samuelsen, G.B., Bogdanovic, N., and Pakkenberg, B. (2008). Reduced cell number in the neocortical part of the human fetal brain in Down syndrome. *Ann Anat* 190, 421-427.
- Laws, G., Bishop, D.V. (2003). A comparison of language abilities in adolescents with Down syndrome and children with specific language impairment. *J Speech Lang Hear Res* 46, 1324-1339.
- 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. *Child Neuropsychol* 15, 1-19.
- Letourneau, A., Santoni, F.A., Bonilla, X., Sailani, M.R., Gonzalez, D., Kind, J., Chevalier, C., Thurman, R., Sandstrom, R.S., Hibaoui, Y., Garieri, M., Popadin, K., Falconnet, E., Gagnebin, M., Gehrig, C., Vannier, A., Guipponi, M., Farinelli, L., Robyr, D., Migliavacca, E., Borel, C., Deutsch, S., Feki, A., Stamatoyannopoulos, J.A., Herault, Y., van Steensel, B., Guigo, R., Antonarakis, S.E. (2014). Domains of genome-wide gene expression dysregulation in Down's syndrome. *Nature* 508, 345-350.
- Leverenz, J.B., Raskind, M.A. (1998). Early amyloid deposition in the medial temporal lobe of young Down syndrome patients: a regional quantitative analysis. *Exp Neurol* 150, 296-304.
- Li, Z., Yu, T., Morishima, M., Pao, A., LaDuca, J., Conroy, J., Nowak, N., Matsui, S., Shiraishi, I., and Yu, Y.E. (2007). Duplication of the entire 22.9 Mb human chromosome 21 syntenic region on mouse chromosome 16 causes cardiovascular and gastrointestinal abnormalities. *Hum Mol Genet* 16, 1359-1366.
- Liebmann PM1, Wölfler A, Schauenstein K. (1997). Interaction of the epiphysis and the immune system. *Wien Klin Wochenschr* 109, 730-736.

- Lin, L., Huang, Q.X., Yang, S.S., Chu, J., Wang, J.Z., Tian, Q. (2013). Melatonin in Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci* *14*, 14575-14593.
- 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* *35*, 1170-1174, 1176, 1178 passim.
- Liu, F., Z. Liang, J. Wegiel, Y. W. Hwang, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, N. Ramakrishna, and Gong, C.X.(2008). Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *Faseb j* *22*, 3224-3233.
- Liu, X.J., Yuan, L., Yang, D., Han, W.N., Li, Q.S., Yang, W., Liu, Q.S., Qi, J.S. (2013). Melatonin protects against amyloid- β -induced impairments of hippocampal LTP and spatial learning in rats. *Synapse* *67*, 626-636.
- Llorens-Martín, M., Torres-Alemán, I., and Trejo, J.L. (2006). Pronounced individual variation in the response to the stimulatory action of exercise on immature hippocampal neurons. *Hippocampus* *16*, 480-490.
- Llorens-Martín, M.V., Rueda, N., Tejada, G.S., Flórez, J., Trejo, J.L., and Martínez-Cué, C. (2010). Effects of voluntary physical exercise on adult hippocampal neurogenesis and behavior of Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Neuroscience* *171*, 1228-1240.
- Lockrow, J., Prakasam, A., Huang, P., Bimonte-Nelson, H., Sambamurti, K., and Granholm, A.C. (2009). Cholinergic degeneration and memory loss delayed by vitamin E in a Down syndrome mouse model. *Exp Neurol* *216*, 278-289.
- Lockrow, J., Boger, H., Gerhardt, G., Aston-Jones, G., Bachman, D., Granholm, A.C. (2011). A noradrenergic lesion exacerbates neurodegeneration in a Down syndrome mouse model. *J Alzheimers Dis* *23*, 471-489.
- Lockstone, H.E., Harris, L.W., Swatton, J.E., Wayland, M.T., Holland, A.J., Bahn, S. (2007). Gene expression profiling in the adult Down syndrome brain. *Genomics* *90*, 647-660.
- Lorenzi, H.A., and Reeves, R.H. (2006). Hippocampal hypocellularity in the Ts65Dn mouse originates early in development. *Brain Res* *1104*, 153-159.
- Lott, I.T., and Dierssen, M. (2010). Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with Down's syndrome. *Lancet Neurol* *9*, 623-633.
- Lott, I.T. (2012). Antioxidants in Down syndrome. *Biochim Biophys Acta* *1822*, 657-663.
- Loudin, M.G., Wang, J., Leung, H.C., Gurusiddappa, S., Meyer, J., Condos, G., Morrison, D., Tsimelzon, A., Devidas, M., Heerema, N.A., Carroll, A.J., Plon, S.E., Hunger, S.P., Basso, G., Pession, A., Bhojwani, D., Carroll, W.L., Rabin, K.R. (2011). Genomic profiling in Down

Bibliografía

- syndrome acute lymphoblastic leukemia identifies histone gene deletions associated with altered methylation profiles. *Leukemia* 25, 1555-1563.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-75.
- Lubec, B., Yoo, B.C., Dierssen, M., Balic, N., Lubec, G. (2001). Down syndrome patients start early prenatal life with normal cholinergic, monoaminergic and serotonergic innervation. *J Neural Transm Suppl* 61, 303-310.
- Lumbreras, M., Baamonde, C., Martínez-Cué, C., Lubec, G., Cairns, N., Sallés, J., Dierssen, M., Flórez, J. (2006). Brain G protein-dependent signaling pathways in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Amino Acids* 31, 449-456.
- Lyle, R., Béna, F., Gagos, S., Gehrig, C., Lopez, G., Schinzel, A., Lespinasse, J., Bottani, A., Dahoun, S., Taine, L., *et al.* (2009). Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 17, 454-466.
- Mahlberg, R., Kunz, D., Sutej, I., Kühl, K.P., Hellweg, R. (2004). Melatonin treatment of day-night rhythm disturbances and sundowning in Alzheimer disease: an open-label pilot study using actigraphy. *J Clin Psychopharmacol* 24, 456-459.
- Maity, P., Bindu, S., Dey, S., Goyal, M., Alam, A., Pal, C., Reiter, R., Bandyopadhyay, U. (2009). Melatonin reduces indomethacin-induced gastric mucosal cell apoptosis by preventing mitochondrial oxidative stress and the activation of mitochondrial pathway of apoptosis. *J Pineal Res* 46, 314-323.
- Maltese, A., Pepi, A., Scifo, L., Roccella, M. (2014). Referential communication skills in children with Down Syndrome. *Minerva Pediatr* 66, 7-16.
- Manda, K., Reiter, R.J. (2010). Melatonin maintains adult hippocampal neurogenesis and cognitive functions after irradiation. *Prog Neurobiol* 90, 60-68.
- Mann, D.M., Yates, P.O., Marcyniuk, B., and Ravindra, C.R. (1985). Pathological evidence for neurotransmitter deficits in Down's syndrome of middle age. *J Ment Defic Res* 29 (Pt 2), 125-135.
- Marin-Padilla, M. (1976). Pyramidal cell abnormalities in the motor cortex of a child with Down's syndrome. A Golgi study. *J Comp Neurol* 167, 63-81.
- Martínez-Cué, C., Baamonde, C., Lumbreras, M., Paz, J., Davisson, M.T., Schmidt, C., Dierssen, M., and Flórez, J. (2002). Differential effects of environmental enrichment on behavior and learning of male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Behav Brain Res* 134, 185-200.

- Martínez-Cué, C., Rueda, N., García, E., Davisson, M.T., Schmidt, C., and Flórez, J. (2005). Behavioral, cognitive and biochemical responses to different environmental conditions in male Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Behav Brain Res* 163, 174-185.
- Martínez-Cué, C., Rueda, N., García, E., and Flórez, J. (2006). Anxiety and panic responses to a predator in male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Genes Brain Behav* 5, 413-422.
- Martínez-Cué, C., Martínez, P., Rueda, N., Vidal, R., García, S., Vidal, V., Corrales, A., Montero, J.A., Pazos, A., Flórez, J., *et al.* (2013). Reducing GABAA α 5 Receptor-Mediated Inhibition Rescues Functional and Neuromorphological Deficits in a Mouse Model of Down Syndrome. *J Neurosci* 33, 3953-3966.
- Martínez-Cué, C., Delatour, B. and Potier, M.C.(2014). Treating enhanced GABAergic inhibition in Down syndrome: Use of GABA α 5-selective inverse agonists. *Neurosci Biobehav Rev*.
- Martínez-Serrano, A., Fischer, W., Söderström, S., Ebendal, T., and Björklund, A. (1996). Long-term functional recovery from age-induced spatial memory impairments by nerve growth factor gene transfer to the rat basal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6355-6360.
- Matsubara, E., Bryant-Thomas, T., Pacheco Quinto, J., Henry, T.L., Poeggeler, B., Herbert, D., Cruz-Sanchez, F., Chyan, Y.J., Smith, M.A., Perry, G., Shoji, M., Abe, K., Leone, A., Grundke-Ikbal, I., Wilson, G.L., Ghiso, J., Williams, C., Refolo, L.M., Pappolla, M.A., Chain, D.G., Neria, E. (2003). Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 85, 1101-1108.
- Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antoli, I., Herrera, F., Martin, V., Rodriguez, C. (2002). Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci* 59, 1706-1713.
- Megías, M., Verduga, R., Dierssen, M., Flórez, J., Insausti, R., and Crespo, D. (1997). Cholinergic, serotonergic and catecholaminergic neurons are not affected in Ts65Dn mice. *Neuroreport* 8, 3475-3478.
- Merchant, N.M., Azzopardi, D.V., Hawwa, A.F., McElnay, J.C., Middleton, B., Arendt, J., Arichi, T., Gressens, P., Edwards, A.D. (2013). Pharmacokinetics of melatonin in preterm infants. *Br J Clin Pharmacol* 76, 725-733.
- Millan Sanchez, M., Heyn S.N., Das D., Moghadam S., Martin K.J., and Salehi, A.(2012). Neurobiological elements of cognitive dysfunction in Down syndrome: exploring the role of APP. *Biol Psychiatry* 71, 403-409.
- Miller, E., Morel, A., Saso, L., Saluk, J. (2014). Melatonin Redox Activity. Its Potential Clinical Application in Neurodegenerative Disorders. *Curr Top Med Chem*[Epub ahead of print]

Bibliografia

- Mishima, K., Okawa, M., Hozumi, S., Hishikawa, Y. (2000). Supplementary administration of artificial bright light and melatonin as potent treatment for disorganized circadian rest-activity and dysfunctional autonomic and neuroendocrine systems in institutionalized demented elderly persons. *Chronobiol Int* 17, 419-432.
- Mok, K.Y., Jones, E.L., Hanney, M., Harold, D., Sims, R., Williams, J., Ballard, C., Hardy, J. (2014). Polymorphisms in BACE2 may affect the age of onset Alzheimer's dementia in Down syndrome. *Neurobiol Aging* 35, 1513.e1-5.
- Moldrich, R.X., Dauphinot, L., Laffaire, J., Rossier, J., Potier, M.C. (2007). Down syndrome gene dosage imbalance on cerebellum development. *Prog Neurobiol* 82, 87-94.
- Molinari, E.J., North, P.C., Dubocovich, M.L. (1996). 2-[125I]iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2 binding sites. *Eur J Pharmacol* 301, 159-168.
- Moriya, T., Horie, N., Mitome, M., Shinohara, K. (2007). Melatonin influences the proliferative and differentiative activity of neural stem cells. *J Pineal Res* 42, 411-418.
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., and O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681-683.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11, 47-60.
- Morris, R.G., Schenk, F., Tweedie, F., and Jarrard, L.E. (1990). Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning. *Eur J Neurosci* 2, 1016-1028.
- Mylykangas, L., Wavrant-De Vrièze, F., Polvikoski, T., Notkola, I.L., Sulkava, R., Niinistö, L., Edland, S.D., Arepalli, S., Adighibe, O., Compton, D., Hardy, J., Haltia, M., Tienari, P.J. (2005). Chromosome 21 BACE2 haplotype associates with Alzheimer's disease: a two-stage study. *J Neurol Sci* 236, 17-24.
- Nadel, L. (2003). Down's syndrome: a genetic disorder in biobehavioral perspective. *Genes Brain Behav* 2, 156-166.
- Nash, H., Heath, J. (2011). The role of vocabulary, working memory and inference making ability in reading comprehension in Down syndrome. *Res Dev Disabil* 32, 1782-1791.
- Netzer, W.J., Powell, C., Nong, Y., Blundell, J., Wong, L., Duff, K., Flajolet, M., and Greengard, P. (2010). Lowering beta-amyloid levels rescues learning and memory in a Down syndrome mouse model. *PLoS One* 5, e10943.
- Newpher, T.M., and Ehlers, M.D. (2009). Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity. *Trends Cell Biol* 19, 218-227.

- Nieminen, K., Suarez-Isla, B.A., Rapoport, S.I. (1988). Electrical properties of cultured dorsal root ganglion neurons from normal and trisomy 21 human fetal tissue. *Brain Res* 474, 246-254.
- Nieuwenhuis-Mark, R.E. (2009). Diagnosing Alzheimer's dementia in Down syndrome: problems and possible solutions. *Res Dev Disabil* 30, 827-838.
- Numminen, H., Service, E., Ahonen, T., Ruoppila, I. (2001). Working memory and everyday cognition in adults with Down's syndrome. *J Intellect Disabil Res* 45, 157-168.
- O'Doherty, A., Ruf, S., Mulligan, C., Hildreth, V., Errington, M.L., Cooke, S., Sesay, A., Modino, S., Vanes, L., Hernandez, D., *et al.* (2005). An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with Down syndrome phenotypes. *Science* 309, 2033-2037.
- Oddo, S., A. Caccamo, J. D. Shepherd, M. P. Murphy, T. E. Golde, R. Kaye, R. Metherate, M. P. Mattson, Y. Akbari, and LaFerla, F.M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409-421.
- Okatani, Y., Okamoto, K., Hayashi, K., Wakatsuki, A., Tamura, S., Sagara, Y. (1998). Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term. *J Pineal Res* 25, 129-134.
- Okatani, Y., Wakatsuki, A., Reiter, R.J., Miyahara, Y. (2002). Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse. *Neurobiol Aging* 23, 639-644.
- Okatani, Y., Wakatsuki, A., Reiter, R.J., Enzan, H., Miyahara, Y. (2003). Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *Eur J Pharmacol* 469, 145-152.
- Olcese, J.M., Cao, C., Mori, T., Mamcarz, M.B., Maxwell, A., Runfeldt, M.J., Wang, L., Zhang, C., Lin, X., Zhang, G., Arendash, G.W. (2009). Protection against cognitive deficits and markers of neurodegeneration by long-term oral administration of melatonin in a transgenic model of Alzheimer disease. *J Pineal Res* 47, 82-96.
- Olson, L.E., Richtsmeier, J.T., Leszl, J., and Reeves, R.H. (2004). A chromosome 21 critical region does not cause specific Down syndrome phenotypes. *Science* 306, 687-690.
- Olson, L.E., Roper, R.J., Sengstaken, C.L., Peterson, E.A., Aquino, V., Galdzicki, Z., Siarey, R., Pletnikov, M., Moran, T.H., and Reeves, R.H. (2007). Trisomy for the Down syndrome 'critical region' is necessary but not sufficient for brain phenotypes of trisomic mice. *Hum Mol Genet* 16, 774-782.
- Ozcan, M., Yilmaz, B., Carpenter, D.O. (2006). Effects of melatonin on synaptic transmission and long-term potentiation in two areas of mouse hippocampus. *Brain Res* 1111, 90-94.

Bibliografía

- Özcengiz, D., Gunes, Y., Ozmete, O. (2011). Oral melatonin, dexmedetomidine, and midazolam for prevention of postoperative agitation in children. *J Anesth* 25, 184-188.
- 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* 7, 211-220.
- Palm, L., Blennow, G., Wetterberg, L. (1997). Long-term melatonin treatment in blind children and young adults with circadian sleep-wake disturbances. *Dev Med Child Neurol* 39, 319-325.
- Pandi-Perumal, S.R., BaHammam, A.S., Brown, G.M., Spence, D.W., Bharti, V.K., Kaur, C., Hardeland, R., Cardinali, D.P. (2013). Melatonin antioxidative defense: therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes. *Neurotox Res* 23, 267-300.
- Papoulidis, I., Papageorgiou, E., Siomou, E., Oikonomidou, E., Thomaidis, L., Vetro, A., Zuffardi, O., Liehr, T., Manolakos, E., Vassilis, P. (2014). A patient with partial trisomy 21 and 7q deletion expresses mild Down syndrome phenotype. *Gene* 536, 441-443.
- Pereira, P.L., Magnol, L., Sahún, I., Brault, V., Duchon, A., Prandini, P., Gruart, A., Bizot, J.C., Chadeaux-Vekemans, B., Deutsch, S., *et al.* (2009). A new mouse model for the trisomy of the *Abcg1-U2af1* region reveals the complexity of the combinatorial genetic code of down syndrome. *Hum Mol Genet* 18, 4756-4769.
- Pérez-Cremades, D., Hernández, S., Blasco-Ibáñez, J.M., Crespo, C., Nacher, J., and Varea, E. (2010). Alteration of inhibitory circuits in the somatosensory cortex of Ts65Dn mice, a model for Down's syndrome. *J Neural Transm* 117, 445-455.
- Perluigi, M., Butterfield, D.A. (2011). The identification of protein biomarkers for oxidative stress in Down syndrome. *Expert Rev Proteomics* 8, 427-429.
- Perluigi, M., Butterfield, D.A. (2012). Oxidative Stress and Down syndrome: A Route toward Alzheimer-Like Dementia. *Curr Gerontol Geriatr Res* 2012:724904.
- Petrosini, L., Leggio, M.G., and Molinari, M. (1998). The cerebellum in the spatial problem solving: a co-star or a guest star? *Prog Neurobiol* 56, 191-210.
- Pieri, C., Marra, M., Moroni, F., Recchioni, R., Marcheselli, F. (1994). Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 55, PL271-276.
- Pierrefiche, G., Zerbib, R., Laborit, H. (1993). Anxiolytic activity of melatonin in mice: involvement of benzodiazepine receptors. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 82, 131-142.

- Pinter, J.D., Brown, W.E., Eliez, S., Schmitt, J.E., Capone, G.T., and Reiss, A.L. (2001a). Amygdala and hippocampal volumes in children with Down syndrome: a high-resolution MRI study. *Neurology* 56, 972-974.
- 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, 1659-1665.
- Pollonini, G., Gao, V., Rabe, A., Palminiello, S., Albertini, G., and Alberini, C.M. (2008). Abnormal expression of synaptic proteins and neurotrophin-3 in the Down syndrome mouse model Ts65Dn. *Neuroscience* 156, 99-106.
- Powell, D., Caban-Holt, A., Jicha, G., Robertson, W., Davis, R., Gold, B.T., Schmitt, F.A., Head, E. (2014). Frontal white matter integrity in adults with Down syndrome with and without dementia. *Neurobiol Aging* 35, 1562-1569.
- Prinz, M., Prinz, B., and Schulz, E. (1997). The growth of non-pyramidal neurons in the primary motor cortex of man: a Golgi study. *Histol Histopathol* 12, 895-900.
- Pritchard, M.A., and Kola, I. (1999). The "gene dosage effect" hypothesis versus the "amplified developmental instability" hypothesis in Down syndrome. *J Neural Transm Suppl* 57, 293-303.
- Pritchard, M., Reeves, R.H., Dierssen, M., Patterson, D., Gardiner, K.J. (2007). Down syndrome and the genes of human chromosome 21: current knowledge and future potentials. Report on the Expert workshop on the biology of chromosome 21 genes: towards gene-phenotype correlations in Down syndrome. *Cytogenet Genome Res* 121, 67-77.
- Radogna, F., Cristofanon, S., Paternoster, L., D'Alessio, M., De Nicola, M., Cerella, C., Dicato, M., Diederich, M., Ghibelli, L. (2008). Melatonin antagonizes the intrinsic pathway of apoptosis via mitochondrial targeting of Bcl-2. *J Pineal Res* 44, 316-325.
- Ramírez-Rodríguez, G., Klempin, F., Babu, H., Benítez-King, G., Kempermann, G. (2009). Melatonin modulates cell survival of new neurons in the hippocampus of adult mice. *Neuropsychopharmacology* 34, 2180-2191.
- Ramírez-Rodríguez, G., Ortíz-López, L., Domínguez-Alonso, A., Benítez-King, G.A., Kempermann, G. (2011). Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. *J Pineal Res* 50, 29-37.
- Ramírez-Rodríguez, G., Vega-Rivera, N.M., Benítez-King, G., Castro-García, M., Ortíz-López, L. (2012). Melatonin supplementation delays the decline of adult hippocampal neurogenesis during normal aging of mice. *Neurosci Lett* 530, 53-58.
- Ramírez-Rodríguez, G., Vega-Rivera, N.M., Oikawa-Sala, J., Gómez-Sánchez, A., Ortiz-López, L., Estrada-Camarena, E. (2014). Melatonin synergizes with citalopram to induce

Bibliografía

- antidepressant-like behavior and to promote hippocampal neurogenesis in adult mice. *J Pineal Res* 56, 450-461.
- Rasmussen, D.D., Boldt, B.M., Wilkinson, C.W., Yellon, S.M., Matsumoto, A.M. (1999). Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology* 140, 1009-1012.
- 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., and Acker, J.D. (1995). Selective neuroanatomic abnormalities in Down's syndrome and their cognitive correlates: evidence from MRI morphometry. *Neurology* 45, 356-366.
- Reeves, R.H., Irving, N.G., Moran, T.H., Wohn, A., Kitt, C., Sisodia, S.S., Schmidt, C., Bronson, R.T., and Davisson, M.T. (1995). A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat Genet* 11, 177-184.
- Reeves, R.H. (2000). Recounting a genetic story. *Nature* 405, 283-284.
- Reeves, R.H. (2006). Down syndrome mouse models are looking up. *Trends Mol Med* 12, 237-240.
- Reiter, R.J. (1986). Normal patterns of melatonin levels in the pineal gland and body fluids of humans and experimental animals. *J Neural Transm Suppl* 21, 35-54.
- Reiter, R.J. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 12, 151-180.
- Reiter, R.J., Barlow-Walden, L., Poeggeler, B., Heiden, S.M., Clayton, R.J. (1996). Twenty-four hour urinary excretion of 6-hydroxymelatonin sulfate in Down syndrome subjects. *J Pineal Res* 20, 45-50.
- Reiter, R.J., Guerrero, J.M., Escames, G., Pappolla, M.A., Acuña-Castroviejo, D. (1997). Prophylactic actions of melatonin in oxidative neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 825, 70-78.
- Reiter, R.J., Garcia, J.J., Pie, J. (1998). Oxidative toxicity in models of neurodegeneration: responses to melatonin. *Restor Neurol Neurosci* 12, 135-142.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Leon, J., Czarnocki, Z. (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 50, 1129-1146.
- Reiter R.J., Tan D.X., Sánchez-Barceló E.J., Mediavilla M.D., Gitto E., Korkmaz A. (2011). Circadian mechanisms in the regulation of melatonin synthesis: disruption with light at night and the pathophysiological consequences. *J. Exp Integr. Med.* 1, 13-22.

- Rennie, K., De Butte, M., Pappas, B.A. (2009). Melatonin promotes neurogenesis in dentate gyrus in the pinealectomized rat. *J Pineal Res.*47, 313-317.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R., Ebisawa, T. (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13, 1177-1185.
- Reynolds, L.E., Watson, A.R., Baker, M., Jones, T.A., D'Amico, G., Robinson, S.D., Joffre, C., Garrido-Urbani, S., Rodriguez-Manzanque, J.C., Martino-Echarri, E., Aurrand-Lions, M., Sheer, D., Dagna-Bricarelli, F., Nizetic, D., McCabe, C.J., Turnell, A.S., Kermorgant, S., Imhof, B.A., Adams, R., Fisher, E.M., Tybulewicz, V.L., Hart, I.R., Hodivala-Dilke, K.M. (2010). Tumour angiogenesis is reduced in the Tc1 mouse model of Down's syndrome. *Nature* 465, 813-817.
- Richtsmeier, J.T., Zumwalt, A., Carlson, E.J., Epstein, C.J., and Reeves, R.H. (2002). Craniofacial phenotypes in segmentally trisomic mouse models for Down syndrome. *Am J Med Genet* 107, 317-324.
- Riedemann, T., Patchev, A.V., Cho, K., Almeida, O.F. (2010). Corticosteroids: way upstream. *Mol Brain* 3:2
- Risser, D., Lubec, G., Cairns, N., and Herrera-Marschitz, M. (1997). Excitatory amino acids and monoamines in parahippocampal gyrus and frontal cortical pole of adults with Down syndrome. *Life Sci* 60, 1231-1237.
- Roberson, R., Kuddo, T., Horowitz, K., Caballero, M., Spong, C.Y. (2012). Cytokine and chemokine alterations in Down syndrome. *Am J Perinatol* 29, 705-708.
- Roberts, J.E., Price, J., Malkin, C. (2007). Language and communication development in Down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 13, 26-35.
- Roper, R.J., and Reeves, R.H. (2006a). Understanding the basis for Down syndrome phenotypes. *PLoS Genet* 2, e50.
- Roper, R.J., Baxter, L.L., Saran, N.G., Klinedinst, D.K., Beachy, P.A., and Reeves, R.H. (2006b). Defective cerebellar response to mitogenic Hedgehog signaling in Down [corrected] syndrome mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*103, 1452-1456.
- Rosales-Corral, S., Tan, D.X., Reiter, R.J., Valdivia-Velázquez, M., Martínez-Barboza, G., Acosta-Martínez, J.P., Ortiz, G.G. (2003). Orally administered melatonin reduces oxidative stress and proinflammatory cytokines induced by amyloid-beta peptide in rat brain: a comparative, *in vivo* study versus vitamin C and E. *J Pineal Res* 35, 80-84.
- Rosales-Corral, S., Acuna-Castroviejo, D., Tan, D.X., López-Armas, G., Cruz-Ramos, J., Munoz, R., Melnikov, V.G., Manchester, L.C., Reiter, R.J. (2012). Accumulation of exogenous

Bibliografía

- amyloid-beta peptide in hippocampal mitochondria causes their dysfunction: a protective role for melatonin. *Oxid Med Cell Longev* 2012:843649.
- Rueda, N., Mostany, R., Pazos, A., Flórez, J., and Martínez-Cué, C. (2005). Cell proliferation is reduced in the dentate gyrus of aged but not young Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Neurosci Lett* 380, 197-201.
- Rueda, N., Flórez, J., and Martínez-Cué, C. (2008a). Chronic pentylentetrazole but not donepezil treatment rescues spatial cognition in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Neurosci Lett* 433, 22-27.
- Rueda, N., Flórez, J., and Martínez-Cué, C. (2008b). Effects of chronic administration of SGS-111 during adulthood and during the pre- and post-natal periods on the cognitive deficits of Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Behav Brain Res* 188, 355-367.
- Rueda, N., Llorens-Martín, M., Flórez, J., Valdizán, E., Banerjee, P., Trejo, J.L., and Martínez-Cué, C. (2010). Memantine normalizes several phenotypic features in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *J Alzheimers Dis* 21, 277-290.
- Rueda, N., Flórez, J., and Martínez-Cué, C. (2011). The Ts65Dn mouse model of Down syndrome shows reduced expression of the Bcl-X(L) antiapoptotic protein in the hippocampus not accompanied by changes in molecular or cellular markers of cell death. *Int J Dev Neurosci* 29, 711-716.
- Rueda, N., Flórez, J., and Martínez-Cué, C. (2012). Mouse models of Down syndrome as a tool to unravel the causes of mental disabilities. *Neural Plast* 2012: 584071.
- Shichiri, M., Yoshida, Y., Ishida, N., Hagihara, Y., Iwahashi, H., Tamai, H., Niki, E. (2011). α -Tocopherol suppresses lipid peroxidation and behavioral and cognitive impairments in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Free Radic Biol Med* 50, 1801-1811.
- Sago, H., Carlson, E.J., Smith, D.J., Kilbridge, J., Rubin, E.M., Mobley, W.C., Epstein, C.J., and Huang, T.T. (1998). Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6256-6261.
- Sago, H., Carlson, E.J., Smith, D.J., Rubin, E.M., Crnic, L.S., Huang, T.T., and Epstein, C.J. (2000). Genetic dissection of region associated with behavioral abnormalities in mouse models for Down syndrome. *Pediatr Res* 48, 606-613.
- Sairanen, M., Lucas, G., Ernfors, P., Castrén, M., and Castrén, E. (2005). Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 25, 1089-1094.
- Salehi, A., Delcroix, J.D., Belichenko, P.V., Zhan, K., Wu, C., Valletta, J.S., Takimoto-Kimura, R., Kleschevnikov, A.M., Sambamurti, K., Chung, P.P., *et al.* (2006). Increased App

- expression in a mouse model of Down's syndrome disrupts NGF transport and causes cholinergic neuron degeneration. *Neuron* 51, 29-42.
- Salehi, A., Faizi, M., Colas, D., Valletta, J., Laguna, J., Takimoto-Kimura, R., Kleschevnikov, A., Wagner, S.L., Aisen, P., Shamloo, M., *et al.* (2009). Restoration of norepinephrine-modulated contextual memory in a mouse model of Down syndrome. *Sci Transl Med* 1, 7-17.
- Sango, K., Yamanaka, S., Hoffmann, A., Okuda, Y., Grinberg, A., Westphal, H., McDonald, M.P., Crawley, J.N., Sandhoff, K., Suzuki, K., *et al.* (1995). Mouse models of Tay-Sachs and Sandhoff diseases differ in neurologic phenotype and ganglioside metabolism. *Nat Genet* 11, 170-176.
- Satgé, D., Stiller, C.A., Rutkowski, S., von Bueren, A.O., Lacour, B., Sommelet, D., Nishi, M., Massimino, M., Garré, M.L., Moreno, F., Hasle, H., Jakab, Z., Greenberg, M., von der Weid, N., Kuehni, C., Zurriaga, O., Vicente, M.L., Peris-Bonet, R., Benesch, M., Vekemans, M., Sullivan, S.G., Rickert, C. (2013). A very rare cancer in Down syndrome: medulloblastoma. Epidemiological data from 13 countries. *J Neurooncol* 112, 107-114.
- Seo, H., and Isacson, O. (2005). Abnormal APP, cholinergic and cognitive function in Ts65Dn Down's model mice. *Exp Neurol* 193, 469-480.
- Serón-Ferré, M., Mendez, N., Abarzua-Catalan, L., Vilches, N., Valenzuela, F.J., Reynolds, H.E., Llanos, A.J., Rojas, A., Valenzuela, G.J., Torres-Farfan, C. (2012). Circadian rhythms in the fetus. *Mol Cell Endocrinol* 349, 68-75.
- Sawa, A., Oyama, F., Cairns, N.J., Amano, N., and Matsushita, M. (1997). Aberrant expression of bcl-2 gene family in Down's syndrome brains. *Brain Res Mol Brain Res* 48, 53-59.
- Schliebs, R., and Arendt, T. (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* 221, 555-563.
- Schmid, R.G., Tirsch, W.S., Rappelsberger, P., Weinmann, H.M., and Pöppel, S.J. (1992). Comparative coherence studies in healthy volunteers and Down's syndrome patients from childhood to adult age. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 83, 112-123.
- Schneider, C., Risser, D., Kirchner, L., Kitzmüller, E., Cairns, N., Prast, H., Singewald, N., and Lubec, G. (1997). Similar deficits of central histaminergic system in patients with Down syndrome and Alzheimer disease. *Neurosci Lett* 222, 183-186.
- Schulz, E., and Scholz, B. (1992). [Neurohistological findings in the parietal cortex of children with chromosome aberrations]. *J Hirnforsch* 33, 37-62.
- Scott, B.S., Becker, L.E., Petit, T.L. (1983). Neurobiology of Down's syndrome. *Prog Neurobiol* 21, 199-237.

Bibliografia

- Seidl, R., Fang-Kircher, S., Bidmon, B., Cairns, N., and Lubec, G. (1999). Apoptosis-associated proteins p53 and APO-1/Fas (CD95) in brains of adult patients with Down syndrome. *Neurosci Lett* 260, 9-12.
- Sella, F., Lanfranchi, S., Zorzi, M. (2013). Enumeration skills in Down syndrome. *Res Dev Disabil* 34, 3798-3806.
- Sendera, T.J., Ma, S.Y., Jaffar, S., Kozlowski, P.B., Kordower, J.H., Mawal, Y., Saragovi, H.U., Mufson, E.J. (2000). Reduction in TrkA-immunoreactive neurons is not associated with an overexpression of galaninergic fibers within the nucleus basalis in Down's syndrome. *J Neurochem* 74, 1185-1196.
- Seo, H., and Isacson, O. (2005). Abnormal APP, cholinergic and cognitive function in Ts65Dn Down's model mice. *Exp Neurol* 193, 469-480.
- Shapiro, B.L. (2001). Developmental instability of the cerebellum and its relevance to Down syndrome. *J Neural Transm Suppl*, 11-34.
- Shichiri, M., Yoshida, Y., Ishida, N., Hagihara, Y., Iwahashi, H., Tamai, H., and Niki, E. (2011). α -Tocopherol suppresses lipid peroxidation and behavioral and cognitive impairments in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Free Radic Biol Med* 50, 1801-1811.
- 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. *Neurosci Lett* 324, 209-212.
- Shin, M., Besser, L.M., Kucik, J.E., Lu, C., Siffel, C., Correa, A., and Collaborative, C.A.M.P.a.S. (2009). Prevalence of Down syndrome among children and adolescents in 10 regions of the United States. *Pediatrics* 124, 1565-1571.
- Shott, S.R. (2006a). Down syndrome: common otolaryngologic manifestations. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 142C, 131-140.
- Shott, S.R., Amin, R., Chini, B., Heubi, C., Hotze, S., Akers, R. (2006b). Obstructive sleep apnea: Should all children with Down syndrome be tested? *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132, 432-436.
- Shukkur, E.A., Shimohata, A., Akagi, T., Yu, W., Yamaguchi, M., Murayama, M., Chui, D., Takeuchi, T., Amano, K., Subramhanya, K.H., Hashikawa, T., Sago, H., Epstein, C.J., Takashima, A., Yamakawa, K. (2006). Mitochondrial dysfunction and tau hyperphosphorylation in Ts1Cje, a mouse model for Down syndrome. *Hum Mol Genet* 15, 2752-2762.
- Siarey, R.J., Stoll, J., Rapoport, S.I., and Galdzicki, Z. (1997). Altered long-term potentiation in the young and old Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome. *Neuropharmacology* 36, 1549-1554.

- Siarey, R.J., Kline-Burgess, A., Cho, M., Balbo, A., Best, T.K., Harashima, C., Klann, E., and Galdzicki, Z. (2006). Altered signaling pathways underlying abnormal hippocampal synaptic plasticity in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *J Neurochem* 98, 1266-1277.
- Singh, H.J., Saleh, H.I., Gupalo, S., Omar, E. (2013). Effect of melatonin supplementation on pregnancy outcome in Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley rats. *Sheng Li Xue Bao* 65, 149-157.
- Smigielska-Kuzia, J., Boćkowski, L., Sobaniec, W., Kućak, W., and Sendrowski, K. (2010). Amino acid metabolic processes in the temporal lobes assessed by proton magnetic resonance spectroscopy (1H MRS) in children with Down syndrome. *Pharmacol Rep* 62, 1070-1077.
- Sofroniew, M.V., Howe, C.L., and Mobley, W.C. (2001). Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 24, 1217-1281.
- Song, W., Lahiri, D.K. (1997). Melatonin alters the metabolism of the beta-amyloid precursor protein in the neuroendocrine cell line PC12. *J Mol Neurosci* 9, 75-92.
- Sotthibundhu, A., Phansuwan-Pujito, P., Govitrapong, P. (2010). Melatonin increases proliferation of cultured neural stem cells obtained from adult mouse subventricular zone. *J Pineal Res* 49, 291-300.
- Spuch C., Antequera .D, Isabel Fernandez-Bachiller .M, Isabel Rodríguez-Franco .M, Carro,.E. (2010). A new tacrine-melatonin hybrid reduces amyloid burden and behavioral deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurotox Res* 17, 421-431.
- Srinivasan, V., Kaur, C., Pandi-Perumal, S., Brown, G.M., Cardinali, D.P. (2010). Melatonin and its agonist ramelteon in Alzheimer's disease: possible therapeutic value. *Int J Alzheimers Dis* 2011:741974.
- Stagni, F., Magistretti, J., Guidi, S., Ciani, E., Mangano, C., Calzà, L., Bartesaghi, R. (2013). Pharmacotherapy with fluoxetine restores functional connectivity from the dentate gyrus to field CA3 in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *PLoS One* 8,e61689.
- Starbuck, J.M., Dutka, T., Ratliff, T.S., Reeves, R.H., Richtsmeier, J.T. (2014). Overlapping trisomies for human chromosome 21 orthologs produce similar effects on skull and brain morphology of Dp(16)1Yey and Ts65Dn mice. *Am J Med Genet A* 164, 1981-1990.
- Stehle, J.H., Saade, A., Rawashdeh, O., Ackermann, K., Jilg, A., Sebestény, T., Maronde, E. (2011). A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *J Pineal Res* 51, 17-43.
- Stewart, L.S., Persinger, M.A., Cortez, M.A., and Snead, O.C. (2007). Chronobiometry of behavioral activity in the Ts65Dn model of Down syndrome. *Behav Genet* 37, 388-398.

Bibliografia

- Sturgeon, X., and Gardiner, K.J. (2011). Transcript catalogs of human chromosome 21 and orthologous chimpanzee and mouse regions. *Mamm Genome* 22, 261-271.
- Suetsugu, M., and Mehraein, P. (1980). Spine distribution along the apical dendrites of the pyramidal neurons in Down's syndrome. A quantitative Golgi study. *Acta Neuropathol* 50, 207-210.
- Sutcu, R., Yonden, Z., Yilmaz, A., Delibas, N. (2006). Melatonin increases NMDA receptor subunits 2A and 2B concentrations in rat hippocampus. *Mol Cell Biochem* 283, 101-105.
- Takahashi, Y., Okada, T. (2011). Involvement of the nitric oxide cascade in melatonin-induced inhibition of long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses. *Neurosci Res* 69, 1-7.
- Takashima, S., Becker, L.E., Armstrong, D.L., and Chan, F. (1981). Abnormal neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with down's syndrome. A quantitative and qualitative Golgi study. *Brain Res* 225, 1-21.
- Takashima, S., Ieshima, A., Nakamura, H., and Becker, L.E. (1989). Dendrites, dementia and the Down syndrome. *Brain Dev* 11, 131-133.
- Takashima, S., Iida, K., Mito, T., and Arima, M. (1994). Dendritic and histochemical development and ageing in patients with Down's syndrome. *J Intellect Disabil Res* 38 (Pt 3), 265-273.
- Talaei, S.A., Sheibani, V., Salami, M. (2010). Light deprivation improves melatonin related suppression of hippocampal plasticity. *Hippocampus* 20, 447-455.
- Tan, D.X., Reiter, R.J., Manchester, L.C., Yan, M.T., El-Sawi, M., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Kohen, R., Allegra, M., Hardeland, R. (2002). Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem* 2, 181-197.
- Tan, D.X., Manchester, L.C., Hardeland, R., Lopez-Burillo, S., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Reiter, R.J. (2003). Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res* 34, 75-78.
- Tan, X., Guo, X., Liu, H. (2013). Melatonin attenuates hippocampal neuron apoptosis and oxidative stress during chronic intermittent hypoxia via up-regulating B-cell lymphoma-2 and down-regulating B-cell lymphoma-2-associated X protein. *Saudi Med J* 34, 701-708.
- Tang, W., Huang, Q., Wang, Y., Wang, Z.Y., Yao, Y.Y. (2014). Assessment of CSF A β 42 as an aid to discriminating Alzheimer's disease from other dementias and mild cognitive impairment: a meta-analysis of 50 studies. *J Neurol Sci* 345, 26-36.

- 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. *J Cogn Neurosci* 18, 1555-1569.
- Teipel, S.J., Schapiro, M.B., Alexander, G.E., Krasuski, J.S., Horwitz, B., Hoehne, C., Möller, H.J., Rapoport, S.I., and Hampel, H. (2003). Relation of corpus callosum and hippocampal size to age in nondemented adults with Down's syndrome. *Am J Psychiatry* 160, 1870-1878.
- 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* 127, 811-824.
- Teipel, S.J., and Hampel, H. (2006). Neuroanatomy of Down syndrome in vivo: a model of preclinical Alzheimer's disease. *Behav Genet* 36, 405-415.
- Theuns, J., Brouwers, N., Engelborghs, S., Sleegers, K., Bogaerts, V., Corsmit, E., De Pooter, T., van Duijn, C.M., De Deyn, P.P., Van Broeckhoven, C. (2006). Promoter mutations that increase amyloid precursor-protein expression are associated with Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 78, 936-946.
- Toiber, D., Azkona, G., Ben-Ari, S., Torán, N., Soreq, H., and Dierssen, M. (2010). Engineering DYRK1A overdosage yields Down syndrome-characteristic cortical splicing aberrations. *Neurobiol Dis* 40, 348-359.
- Tongjaroenbuangam, W., Ruksee, N., Mahanam, T., Govitrapong, P. (2013). Melatonin attenuates dexamethasone-induced spatial memory impairment and dexamethasone-induced reduction of synaptic protein expressions in the mouse brain. *Neurochem Int* 63, 482-491.
- Trazzi, S., Mitrugno, V.M., Valli, E., Fuchs, C., Rizzi, S., Guidi, S., Perini, G., Bartesaghi, R., and Ciani, E. (2011). APP-dependent up-regulation of Ptch1 underlies proliferation impairment of neural precursors in Down syndrome. *Hum Mol Genet* 20, 1560-1573.
- 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. *J Biol Chem* 288,20817-20829.
- Trivedi, A.K., Kumar, V. (2014). Melatonin: an internal signal for daily and seasonal timing. *Indian J Exp Biol* 52, 425-437.
- Trubiani, O., Recchioni, R., Moroni, F., Pizzicannella, J., Caputi, S., Di Primio, R. (2005). Melatonin provokes cell death in human B-lymphoma cells by mitochondrial-dependent apoptotic pathway activation. *J Pineal Res* 39, 425-431.

Bibliografía

- Tuzcu, M., Baydas, G. (2006). Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol* 537, 106-110.
- Uberos, J., Romero, J., Molina-Carballo, A., Muñoz-Hoyos, A. (2010). Melatonin and elimination of kynurenines in children with Down's syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab* 23, 277-282.
- Uyanikgil, Y., Baka, M., Ateş, U., Turgut, M., Yavaşoğlu, A., Ulker, S., Sözmen, E.Y., Sezer, E., Elmas, C., Yurtseven, M.E. (2007). Neuroprotective effects of melatonin upon the offspring cerebellar cortex in the rat model of BCNU-induced cortical dysplasia. *Brain Res* 1160, 134-144.
- 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. *Biochem J* 435, 679-688.
- 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. *Neurosci Biobehav Rev* 46, 202-217.
- 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. *Neurobiol Dis* 58, 92-101.
- Vicari, S., Bellucci, S., Carlesimo, G.A. (2000). Implicit and explicit memory: a functional dissociation in persons with Down syndrome. *Neuropsychologia* 38, 240-251.
- Vilardell, M., Rasche, A., Thormann, A., Maschke-Dutz, E., Pérez-Jurado, L.A., Lehrach, H., Herwig, R. (2011). Meta-analysis of heterogeneous Down syndrome data reveals consistent genome-wide dosage effects related to neurological processes. *BMC Genomics* 12:229.
- Villar, A.J., Belichenko, P.V., Gillespie, A.M., Kozy, H.M., Mobley, W.C., and 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. *Mamm Genome* 16, 79-90.
- Vink, J., Incerti, M., Toso, L., Roberson, R., Abebe, D., and Spong, C.Y. (2009). Prenatal NAP+SAL prevents developmental delay in a mouse model of Down syndrome through effects on N-methyl-D-aspartic acid and gamma-aminobutyric acid receptors. *Am J Obstet Gynecol* 200, 524.e521-524.

- 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. *J Intellect Disabil Res* 51, 942-952.
- 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.
- Waller, B.R., McQuinn, T., Phelps, A.L., Markwald, R.R., Lo, C.W., Thompson, R.P., Wessels, A. (2000). Conotruncal anomalies in the trisomy 16 mouse: an immunohistochemical analysis with emphasis on the involvement of the neural crest. *Anat Rec* 260, 279-293
- Wang, X., Figueroa, B.E., Stavrovskaya, I.G., Zhang, Y., Sirianni, A.C., Zhu, S., Day, A.L., Kristal, B.S., Friedlander, R.M. (2009). Methazolamide and melatonin inhibit mitochondrial cytochrome C release and are neuroprotective in experimental models of ischemic injury. *Stroke* 40, 1877-1885.
- Wang, Z., Wu, L., You, W., Ji, C., Chen, G. (2013). Melatonin alleviates secondary brain damage and neurobehavioral dysfunction after experimental subarachnoid hemorrhage: possible involvement of TLR4-mediated inflammatory pathway. *J Pineal Res* 55, 399-408.
- Watanabe, K., Hamada, F., Wakatsuki, A., Nagai, R., Shinohara, K., Hayashi, Y., Imamura, R., Fukaya, T. (2012). Prophylactic administration of melatonin to the mother throughout pregnancy can protect against oxidative cerebral damage in neonatal rats. *J Matern Fetal Neonatal Med* 25, 1254-1259.
- Wegiel, J., Dowjat, K., Kaczmarek, W., Kuchna, I., Nowicki, K., Frackowiak, J., Mazur Koleccka, B., Wegiel, J., Silverman, W.P., Reisberg, B., DeLeon, M., Wisniewski, T., Gong, C.X., Liu, F., Adayev, T., Chen-Hwang, M.C., Hwang, Y.W. (2008). The role of overexpressed DYRK1A protein in the early onset of neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *Acta Neuropathol* 116, 391-407.
- Wegiel, J., Gong, C.X., Hwang, Y.W. (2011). The role of DYRK1A in neurodegenerative diseases. *FEBS J* 278, 236-245.
- Weitzdoerfer, R., Dierssen, M., Fountoulakis, M., and Lubec, G. (2001). Fetal life in Down syndrome starts with normal neuronal density but impaired dendritic spines and synaptosomal structure. *J Neural Transm Suppl*, 59-70.
- Wenger, G.R., Schmidt, C., Davisson, M.T. (2004). Operant conditioning in the Ts65Dn mouse: learning. *Behav Genet* 34, 105-119.
- Wenk, G.L., McGann, K., Mencarelli, A., Hauss-Wegrzyniak, B., Del Soldato, P., and Fiorucci, S. (2000). Mechanisms to prevent the toxicity of chronic neuroinflammation on forebrain cholinergic neurons. *Eur J Pharmacol* 402, 77-85.

Bibliografia

- Whishaw, I.Q., Mittleman, G. (1986). Visits to starts, routes, and places by rats (*Rattus norvegicus*) in swimming pool navigation tasks. *J Comp Psychol* *100*, 422-431.
- Whitaker-Azmitia, P.M. (2001). Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res Bull* *56*, 479-485.
- Whitney, K.N., Wenger, G.R. (2013). Impulsivity and motor activity in aged, male Ts65Dn mice. *Exp Clin Psychopharmacol* *21*, 345-354.
- Whittle, N., Sartori, S.B., Dierssen, M., Lubec, G., and Singewald, N. (2007). Fetal Down syndrome brains exhibit aberrant levels of neurotransmitters critical for normal brain development. *Pediatrics* *120*, e1465-1471.
- Wilcock, D.M., and Griffin, W.S.(2013). Down's syndrome, neuroinflammation, and Alzheimer neuropathogenesis: *J Neuroinflammation* *10*, 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. *Am J Ment Retard* *110*, 378-392.
- Wishart, J.G. (2007). Socio-cognitive understanding: a strength or weakness in Down's syndrome? *J Intellect Disabil Res* *51*, 996-1005.
- Wisniewski, K.E., Laure-Kamionowska, M., Conell, F., and Wen, G.Y. (1986). Neuronal density and synaptogenesis in the postnatal stage of brain maturation in Down syndrome. In *The neurobiology of Down syndrome*, C.J. Epstein, ed. (New York: Raven Press), pp. 29-44.
- Wisniewski, K.E., Bobinski, M. (1991). Hypothalamic abnormalities in Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* *373*, 153-167.
- Wurtman, R.J., Axelrod, J. (1968). The formation, metabolism and physiologic effects of melatonin. *Adv Pharmacol* *6*, 141-151.
- Yan, Z., Feng, J. (2004). Alzheimer's disease: interactions between cholinergic functions and beta-amyloid. *Curr Alzheimer Res* *1*, 241-248.
- Yang, Z., Li, C., Huang, F. (2013). Melatonin impaired acquisition but not expression of contextual fear in rats. *Neurosci Lett* *552*, 10-4.
- Yates, C.M., Simpson, J., and Gordon, A. (1986). Regional brain 5-hydroxytryptamine levels are reduced in senile Down's syndrome as in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* *65*, 189-192.
- 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. *Am J Intellect Dev Disabil* *119*, 17-32.

- Yoo, D.Y., Kim, W., Lee, C.H., Shin, B.N., Nam, S.M., Choi, J.H., Won, M.H., Yoon, Y.S., Hwang, I.K. (2012). Melatonin improves D-galactose-induced aging effects on behavior, neurogenesis, and lipid peroxidation in the mouse dentate gyrus via increasing pCREB expression. *J Pineal Res* 52, 21-28.
- Ypsilanti, A., Grouios, G., Alevriadou, A., Tsapkini, K. (2005). Expressive and receptive vocabulary in children with Williams and Down syndromes. *J Intellect Disabil Res* 49, 353-364.
- Yu, T., Li, Z., Jia, Z., Clapcote, S.J., Liu, C., Li, S., Asrar, S., Pao, A., Chen, R., Fan, N., *et al.* (2010a). A mouse model of Down syndrome trisomic for all human chromosome 21 syntenic regions. *Hum Mol Genet* 19, 2780-2791.
- Yu, T., Liu, C., Belichenko, P., Clapcote, S.J., Li, S., Pao, A., Kleschevnikov, A., Bechard, A.R., Asrar, S., Chen, R., *et al.* (2010b). Effects of individual segmental trisomies of human chromosome 21 syntenic regions on hippocampal long-term potentiation and cognitive behaviors in mice. *Brain Res* 1366, 162-171.
- Zampini, L., D'Odorico, L. (2011). Lexical and syntactic development in Italian children with Down's syndrome. *Int J Lang Commun Disord* 46, 386-396.
- Zhang, Y.C., Wang, Z.F., Wang, Q., Wang, Y.P., Wang, J.Z. (2004). Melatonin attenuates beta-amyloid-induced inhibition of neurofilament expression. *Acta Pharmacol Sin* 25, 447-451.
- Zhang, L., Zhang, H.Q., Liang, X.Y., Zhang, H.F., Zhang, T., Liu, F.E. (2013). Melatonin ameliorates cognitive impairment induced by sleep deprivation in rats: role of oxidative stress, BDNF and CaMKII. *Behav Brain Res* 256, 72-81.
- Zhang, L., Meng, K., Jiang, X., Liu, C., Pao, A., Belichenko, P.V., Kleschevnikov, A.M., Josselyn, S., Liang, P., Ye, P., Mobley, W.C., Yu, Y.E. (2014). Human chromosome 21 orthologous region on mouse chromosome 17 is a major determinant of Down syndrome-related developmental cognitive deficits. *Hum Mol Genet* 23, 578-589.
- Zigman, W.B., Lott, I.T. (2007). Alzheimer's disease in Down syndrome: neurobiology and risk. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 13, 237-246.
- Zigman, W.B. (2013). Atypical aging in Down syndrome. *Dev Disabil Res Rev* 18, 51-67.

