

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA



**Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali**  
**Corso di Laurea Magistrale in Biologia applicata alla Biomedicina**  
*Curriculum Neurobiologico*

Tesi di Laurea Magistrale

**Effetti di un trattamento cronico con fluoxetina nel recupero della memoria  
spaziale e della plasticità sinaptica ippocampale in un modello murino della  
sindrome Down**

Relatore:

*Dott. Alessandro Sale*

Candidato:

*Gabriele Sansevero*

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

## INDICE

<b>Riassunto</b>	pg.4
<b>Capitolo 1 - Introduzione</b>	pg.6
<b>1.1 - La plasticità cerebrale</b>	pg.6
<b>1.2 - Overinhibition e disfunzioni di plasticità cerebrale</b>	pg.7
<b>1.3 - La sindrome di Down</b>	pg.8
<i>1.3.1 - Definizione</i>	pg.8
<i>1.3.2 - Eziopatogenesi</i>	pg.9
<i>1.3.3 - Deficit comportamentali in individui con sindrome di Down</i>	pg.10
<i>1.3.4 - Neuroanatomia della sindrome</i>	pg.12
<b>1.4 - Il modello murino della sindrome di Down: il topo Ts65Dn</b>	pg.16
<i>1.4.1 - Disturbi comportamentali e cognitivi</i>	pg.17
<i>1.4.2 - Neuroanatomia</i>	pg.18
<i>1.4.3 - L'inibizione cerebrale: un modello per il fenotipo dei topi Ts65Dn</i>	pg.19
<b>1.5 - Strategie terapeutiche per il trattamento della sindrome di Down</b>	pg.20
<i>1.5.1 - Arricchimento ambientale e terapia nel topo Ts65Dn</i>	pg.21
<i>1.5.2 - Strategie farmacologiche</i>	pg. 22
<b>1.6 - Scopo della tesi</b>	pg.25
<b>Capitolo 2 - Materiali e metodi</b>	pg.26

<b>2.1 - Animali e stabulazione</b>	pg.26
<b>2.2 - Trattamento farmacologico</b>	pg.26
<b>2.3 - Morris Water Maze</b>	pg.29
<b>2.4 - Novel place recognition task</b>	pg.30
<b>2.5 - Registrazioni elettrofisiologiche <i>in vitro</i>: LTP in ippocampo</b>	pg.30
<b>Capitolo 3 - Risultati</b>	pg.33
<b>3.1 - Valutazione degli effetti pro-convulsivanti della fluoxetina</b>	pg.33
<b>3.2 - Studio della memoria spaziale mediante il Morris Water Maze</b>	pg.35
<b>3.3 - Studio della memoria spaziale mediante il Novel Place Recognition (NPR)</b>	pg.37
<b>3.4 - Studio della plasticità sinaptica a lungo termine nell'ippocampo</b>	pg.39
<b>Discussione</b>	pg.41
<b>Bibliografia</b>	pg.45

## RIASSUNTO

La sindrome di Down, una condizione dovuta alla trisomia del cromosoma 21, è la più comune causa di ritardo mentale su base genetica, con un'incidenza compresa tra 1 su 700 e 1 su 1000 nati vivi. Gli individui affetti da sindrome di Down mostrano una disabilità variabile, da leggera fino a grave, con disfunzioni a carico delle abilità linguistiche, motorie, cognitive e del comportamento adattativo.

Lo studio neurobiologico della sindrome di Down si avvale di numerosi modelli murini transgenici. Nel topo, i geni omologhi a quelli presenti sul braccio lungo del cromosoma umano 21 (hsa 21) sono distribuiti su tre cromosomi: 10, 16, 17. Il modello più studiato è il topo Ts65Dn, che presenta numerose anomalie morfologiche e cognitive del tutto paragonabili a quelle umane, con ben documentati deficit visivi, di attenzione, memoria e apprendimento, dovuti a una parziale trisomia del cromosoma 16 a seguito di una traslocazione robertsoniana. Numerosi studi hanno dimostrato che i deficit cognitivi del topo Ts65Dn sono dovuti a severe compromissioni della plasticità sinaptica a lungo termine, causate da una eccessiva inibizione GABAergica a livello dei circuiti cerebrali.

Di grande interesse clinico è la ricerca di strategie terapeutiche non invasive, idonee all'applicazione sugli individui con sindrome di Down, che siano in grado di ridurre i livelli di inibizione e di promuovere il recupero cognitivo negli individui affetti. Tra i trattamenti più promettenti, una recente pubblicazione dell'Istituto di Neuroscienze del CNR di Pisa (Sale et al., *Nature Neuroscience* – 2007) ha messo in evidenza come protocolli di arricchimento ambientale (AA) possano essere utilizzati con successo negli animali da laboratorio per abbassare il tono di inibizione corticale e riaprire finestre di plasticità neurale anche in individui in età adulta. I risultati di Sale e collaboratori mostrano che l'AA induce un completo recupero delle funzioni visive in roditori adulti ambliopi e che tale recupero è dovuto a una marcata riduzione del tono GABAergico. Tali dati aprono l'interessante possibilità che l'AA possa essere impiegato proficuamente nel trattamento di altre patologie neurologiche caratterizzate da un'eccessiva inibizione cerebrale, come la sindrome di Down. Una ricerca molto recente (Begenisic et al., *Frontiers in Cellular Neuroscience* – 2011) ha dimostrato che l'esposizione a sei settimane di AA in topi Ts65Dn adulti induce un marcato recupero delle capacità di apprendimento e memoria spaziale, dei livelli di plasticità sinaptica ippocampale e delle funzioni visive, assieme ad una riduzione del GABA rilasciato nel lobo limbico e in corteccia visiva.

Un campo di studi di grande interesse clinico è quello relativo alla ricerca di farmaci in grado di riprodurre gli effetti benefici indotti dall'AA (enviromimetic drugs). Nel topo Ts65Dn, la somministrazione sistemica di antagonisti dei recettori GABA-a o GABA-b porta ad una normalizzazione del rilascio di GABA e al recupero delle capacità di apprendimento spaziale e dei livelli di Long-Term Potentiation (LTP) nella circuiteria ippocampale. Nonostante queste evidenze, non sono ancora disponibili trattamenti farmacologici approvati dalla FDA (Food and Drug Administration) capaci di migliorare le condizioni di un soggetto affetto da sindrome Down.

La presente Tesi di Laurea intende investigare gli effetti di un trattamento cronico con fluoxetina nel recupero delle disfunzioni mnemoniche e di plasticità sinaptica ippocampale nel topo Ts65Dn. La fluoxetina è un inibitore selettivo del reuptake della serotonina attualmente utilizzato come trattamento farmacologico standard per numerose patologie psichiatriche. Nella prima parte della Tesi ho eseguito uno studio volto a stabilire un dosaggio appropriato per minimizzare il rischio di effetti collaterali. Precedenti studi hanno dimostrato come la fluoxetina abbia un'azione pro-convulsivante in modelli animali; inoltre, un dosaggio elevato di tale farmaco può essere responsabile di crisi di tipo epilettico anche nell'uomo. Tramite un'indagine dose-effetto ho potuto stabilire che il dosaggio di 10 mg/Kg/die si dimostra sicuro nei topi Ts65Dn, non lasciando registrare nessun caso di attacchi convulsivi o morti improvvise. Nella seconda parte della Tesi, ho quindi potuto valutare gli effetti di un trattamento cronico con fluoxetina al dosaggio precedentemente stabilito; la fluoxetina è stata somministrata nell'acqua da bere per 8 settimane. I risultati hanno mostrato che tale trattamento consente un recupero delle abilità di memoria spaziale e della plasticità sinaptica ippocampale nei topi Ts65Dn adulti.

Complessivamente, i risultati riportati nella presente Tesi di Laurea suggeriscono una possibile applicazione clinica della fluoxetina nel trattamento delle disfunzioni fenotipiche associate alla sindrome di Down.

# 1 - INTRODUZIONE

## 1.1 - La plasticità cerebrale

Con il termine “plasticità cerebrale” si indica quel processo fondamentale per lo sviluppo adattativo dei circuiti nervosi che si esplica tramite la capacità, propria del sistema nervoso, di riorganizzare le sue connessioni, sia strutturalmente che funzionalmente, in risposta a cambiamenti dell’ambiente circostante. Il grado di plasticità cerebrale cambia durante l’arco della vita: è molto alto all’epoca dello sviluppo, mentre decade progressivamente col passaggio alla vita adulta, delineando l’apertura e la chiusura di una finestra temporale, denominata periodo critico (PC), in cui i livelli di plasticità sono molto elevati e le connessioni nervose altamente suscettibili a cambiamenti in risposta agli stimoli esterni. L’esistenza del PC è stata documentata in numerose regioni cerebrali, coinvolte in molteplici funzioni sensoriali e cognitive (Berardi et al., 2000; Hensch, 2004).

I primi pionieristici risultati furono prodotti da Hubel e Wiesel che, negli anni ’60, proposero il sistema visivo come modello paradigmatico per lo studio della plasticità esperienza-dipendente nel sistema nervoso centrale. Tramite registrazioni elettrofisiologiche dalla corteccia visiva primaria (V1), questi autori notarono che i due occhi attivano i neuroni corticali visivi in maniera differenziale e che le cellule che mostrano la stessa preferenza per uno dei due occhi sono raggruppate in colonne di dominanza oculare. In seguito, Hubel e Wiesel riportarono che l’occlusione precoce di un occhio tramite sutura delle palpebre (deprivazione monoculare) durante lo sviluppo determina uno spostamento di dominanza oculare nei neuroni corticali, vale a dire una riduzione nel numero delle cellule che rispondono all’occhio suturato e un robusto incremento del numero di cellule che rispondono all’occhio aperto (Hubel and Wiesel, 1963). Tale spostamento di dominanza oculare è stato riscontrato in tutte le specie con visione binoculare fino ad oggi studiate e, se la deprivazione monoculare viene protratta per lunghi periodi, si accompagna a deficit di sviluppo dell’acuità visiva e riduzione della sensibilità al contrasto nell’occhio deprivato, una condizione nota con il termine di ambliopia.

I livelli di plasticità sono strettamente dipendenti dalla maturazione dei circuiti inibitori cerebrali, regolatori chiave dei processi di modificazione sinaptica esperienza-dipendente, per la loro capacità di modellare i pattern di scarica neuronali. Grazie alla tecnica del gene-targeting, questa ipotesi è stata testata direttamente sopprimendo l’espressione di un enzima responsabile della sintesi del GABA (acido  $\gamma$ -amminobutirrico), riducendone così i

livelli e il rilascio nei terminali sinaptici. I topi che non possono esprimere questo enzima non presentano plasticità di dominanza oculare in risposta a deprivazione monoculare (Hensch et al., 1998). In seguito, da differenti approcci sperimentali sono emersi risultati convergenti che hanno confermato il ruolo chiave dell'inibizione GABAergica nello sviluppo cerebrale e nella plasticità (Huang et al., 1999; Fagiolini e Hensch, 2000; Cancedda et al., 2004; Di Cristo et al., 2007; Sugiyama et al., 2008). In particolare, trattamenti farmacologici o comportamentali in grado di abbassare i livelli cerebrali di GABA si sono dimostrati in grado di riaprire, nel cervello adulto, finestre di plasticità simili al PC (Sale et al., 2007; Maya-Vetencourt et al., 2008; Harauzov et al., 2010). Queste scoperte suggeriscono che i livelli di inibizione intracorticale regolino la plasticità attraverso due soglie: la prima corrispondente al livello minimo oltre la quale la plasticità esperienza-dipendente diviene possibile; la seconda il livello oltre il quale il potenziale di plasticità si riduce notevolmente (chiusura del PC) (Feldman, 2000; Sale et al., 2010).

Un altro fattore chiave coinvolto nella regolazione del PC in corteccia visiva è la neurotrofina *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), che promuove la maturazione dell'inibizione GABAergica corticale e, in parallelo, la chiusura del PC e la maturazione dell'acuità visiva (Huang et al., 1999).

## **1.2 - Overinhibition e disfunzioni di plasticità cerebrale**

Mentre la maturazione fisiologica del sistema GABAergico è fondamentale per lo sviluppo normale della plasticità neurale, livelli eccessivi di inibizione possono causare stati patologici associati a gravi deficit cerebrali. Ad esempio, una eccessiva inibizione (*overinhibition*) (Fernandez e Garner, 2007; Baroncelli et al., 2010) diminuisce i livelli generali di attività nervosa, ostacolando i processi di rimodellamento sinaptico in risposta agli input sensoriali.

Un recente modello presentato da Fernandez e Garner propone che un'intera classe di disordini intellettivi dello sviluppo (*Development Intellectual Disorders* - DID) siano correlati ad elevati livelli di inibizione dei circuiti neuronali. I DID sono forme di menomazione cognitiva non progressiva che colpiscono il 2-3% della popolazione nel mondo industrializzato. Gli affetti sono caratterizzati da un QI inferiore a 70 e da un marcato deficit delle capacità cognitive, adattative ed interpersonali. L'ipotesi è che i DID siano il risultato di cambiamenti a lungo termine nell'eccitabilità neuronale, causati da un aumento della

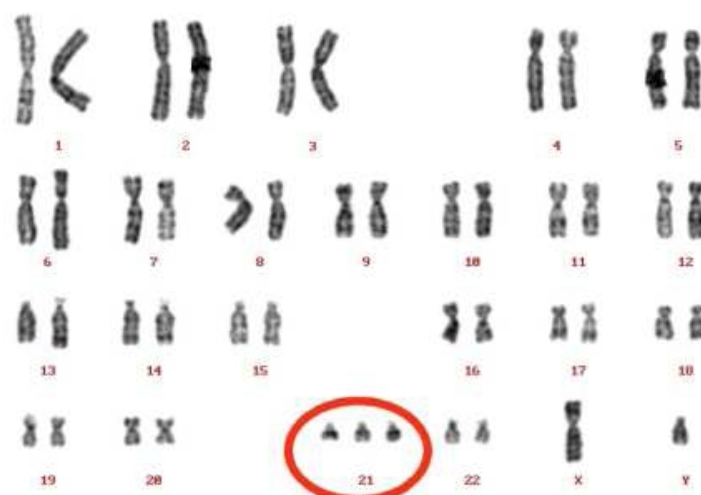
componente inibitoria nei circuiti nervosi. Tale componente comprometterebbe i processi di plasticità associativa che sono alla base dell'apprendimento e della memoria nell'adulto (Fernandez and Garner, 2007).

Un esempio paradigmatico di DID associato a overinhibition è rappresentato dalla sindrome di Down (SD).

### 1.3 - La sindrome di Down

#### 1.3.1 - Definizione

La sindrome di Down, una patologia causata dalla triplicazione del cromosoma 21 (Cr21), è la causa più frequente di ritardo mentale su base genetica, rappresentando il 30% dei casi (Fig. 1.1.). La SD costituisce un serio problema di salute pubblica, con più di 500.000 affetti in Europa, molti dei quali incapaci di condurre una vita autonoma. La SD interessa tutte le etnie ed entrambi i sessi, con stime su scala mondiale che attestano un'incidenza di 1 su 700-1000 nati vivi (Shin et al., 2009). L'incidenza correla positivamente con l'età della madre, come conseguenza del fatto che, con il passare degli anni, i meccanismi di controllo della disgiunzione meiotica perdono efficacia, così come le difese biologiche deputate all'eliminazione degli zigoti anomali. Nello specifico, l'incidenza della SD aumenta rapidamente dopo i 35 anni di età della madre, passando da 1 caso su 2500 nati vivi (madre di età inferiore ai 20 anni) ad 1 caso su 50-100 nati da madri di età maggiore ai 40 anni. In realtà, i concepimenti di zigoti con trisomia 21 sono molto più frequenti, ma circa 3 casi su 4 si evolvono in un aborto o nella nascita di un bambino morto. Se questo non succedesse l'incidenza della sindrome all'interno della popolazione salirebbe a circa 1 caso ogni 200 nati vivi.





*Fig. 1.1. Cariotipo di un uomo con SD; in evidenza la triplicazione del cromosoma 21*

Benché gli individui affetti da SD possano presentare svariate disfunzioni di importanza clinica anche rilevante, i deficit cognitivi ne sono la caratteristica predominante. Il quoziente intellettivo (QI) dei soggetti con SD si attesta in media attorno a 50 (in un range che varia da 30 a 70). L'infanzia è caratterizzata da un ritardo nello sviluppo cognitivo e da valori di QI che addirittura decrescono dal primo anno di età fino alla tarda infanzia (Rachidi e Lopes, 2008). Il fenotipo comportamentale associato alla SD si manifesta durante l'infanzia e si aggrava con il passare degli anni. Esso è caratterizzato da una compromissione del linguaggio, delle capacità motorie e cognitive e dei comportamenti adattativi. Negli individui adulti con SD, inoltre, è stato visto che i valori di QI possono ulteriormente ridursi in concomitanza con la comparsa precoce della demenza di tipo Alzheimer.

Grazie ai progressi nelle cure mediche, oggi gli individui con SD possono vivere più a lungo che in passato, anche rispetto ai propri genitori. Per questo motivo, la necessità di ricercare strategie terapeutiche in grado di migliorare la situazione legata al ritardo mentale sta diventando sempre più urgente. Tuttavia, al momento non esistono terapie in grado di contrastare l'insorgenza delle alterazioni nello sviluppo del sistema nervoso o di alleviare significativamente i deficit associati alla SD.

### **1.3.2 - Eziopatogenesi**

Il 95% dei casi di SD si verifica per una non-disgiunzione durante la prima divisione meiotica dell'oocita (trisomia libera) (Lejeune, Gautiere e Turpin, 1959; Antonarakis et al., 2004; Lyle et al., 2008; Scriver et al., 2001).

I meccanismi biologici che portano alla produzione e divisione degli oociti sono alla base dell'ipotesi, ormai comprovata da tempo (Penrose, 1933; Penrose, 1934), di una correlazione tra incidenza della patologia ed età materna. Sono state proposte diverse teorie che mirano a spiegare l'effetto dell'età materna. L'ipotesi ad oggi più accreditata è che avvengano errori di segregazione durante la meiosi di oociti disomici normali, come dimostrano numerosi studi (Hunt e Hassold, 2008; Jones, 2008; Mailhes, 2008; Martin, 2008; Oliver et al., 2008; Allen et al., 2009; Ghosh et al., 2009). In particolare, la non-disgiunzione meiotica potrebbe essere influenzata dalla durata della meiosi femminile: gli oociti primari si formano molto precocemente durante lo sviluppo ed entrano nella profase della prima

divisione meiotica molto prima della nascita. La meiosi I si completa solo all'ovulazione, di conseguenza l'ovocita di una donna con più di 35 anni può avere accumulato, durante tutto questo periodo, diversi errori metabolici, oppure fattori ambientali possono danneggiare la cellula e favorire l'aneuploidia al momento del completamento della meiosi. In casi più rari, il cromosoma soprannumerario è di origine paterna. Al contrario, l'età paterna non risulta essere un fattore di rischio. A differenza degli oociti, gli spermatozoi vengono prodotti continuamente a partire dalla pubertà, senza intervalli nelle divisioni meiotiche; questo potrebbe spiegare l'origine materna della maggior parte delle aneuploidie nell'uomo.

La non-disgiunzione meiotica porta alla formazione di un gamete con 24 cromosomi e può avvenire in meiosi I o II. L'unione di questo gamete con uno caratterizzato da assetto cromosomico normale darà origine a un embrione con 47 cromosomi (cariotipo 47, XX, +21 oppure 47 XY, +21). Nel 3-4% dei casi, il Cr21 soprannumerario può derivare da una traslocazione robertsoniana. Il braccio lungo del Cr21 è fuso con un altro cromosoma, generalmente acrocentrico (Pueschel et al., 1982; Hook et al., 1983; Koremberg et al., 1994; Lyle et al., 2008). La più comune traslocazione robertsoniana coinvolge i cromosomi 14 e 21 (t(14;21)) ed è prodotta da scambi che avvengono in corrispondenza della porzione prossimale dei bracci corti. La fusione dei bracci corti porta alla formazione di un cromosoma in cui sono presenti entrambi i centromeri, ma con un comportamento finale corrispondente al funzionamento di uno solo dei due. Il piccolo frammento acentrico viene perso, ma senza conseguenze patologiche, poiché è costituito soltanto da sequenze ripetute di rDNA, presenti anche su altri cromosomi acrocentrici. Un individuo portatore presenta quindi due copie del braccio lungo del Cr21 e del Cr14 (21q e 14q) ed una sola copia del braccio corto di entrambi i cromosomi (21p e 14p); nonostante posseggano soltanto 45 cromosomi, si tratta di persone sane che però hanno una maggiore probabilità di generare figli affetti da SD. Durante la meiosi, infatti, i portatori della traslocazione possono produrre gameti sbilanciati che, se fecondati, daranno origine a zigoti monosomici (abortiti spontaneamente) oppure trisomici. La SD da traslocazione robertsoniana viene definita anche familiare, in quanto nel 50% dei casi la traslocazione è presente in un genitore eterozigote. Nel restante 50% dei casi, si origina per una traslocazione de novo. La trisomia familiare non ha alcuna relazione con l'età materna e può derivare sia dal padre che dalla madre.

### ***1.3.3 - Deficit comportamentali in individui con sindrome di Down***

Anche se alcuni individui con SD risultano avere un QI classificabile nel range della normalità, di solito il QI negli individui affetti ricade nella fascia di punteggio che indica un grave ritardo mentale (25-55). Inoltre, raramente l'età mentale supera gli 8 anni di età. Negli individui Down il QI non è costante durante l'arco della vita, ma decresce con l'età, mostrando una precoce decelerazione tra i 6 mesi e i 2 anni e un sostanziale declino durante l'adolescenza. I bambini con SD mostrano, inoltre, un'incompleta e ritardata acquisizione delle capacità motorie, linguistiche, cognitive e adattative rispetto ai loro coetanei sani ed un aumentato rischio di sviluppare svariate psicopatologie.

*Capacità motorie.* I bambini con SD non sono capaci di rotolarsi fino ai 5-6 mesi di età e non sono capaci di sedersi autonomamente fino agli 8-11 mesi. Il ritardo è più grave per gli schemi motori più complessi: il gattonamento comincia a 12-17 mesi e la capacità di camminare viene acquisita tra i 15 e i 74 mesi (Vicari, 2006). Inoltre, sono presenti schemi posturali di movimento atipici (Lydic, 1979).

*Fonazione e capacità linguistiche.* I bambini Down presentano una lenta transizione dal balbettio alla parola e attraversano un periodo più lungo di errori fonologici con scarsa intelligibilità (Chapman e Hesketh, 2000; Stoel Gammon, 2001). Neonati e bambini con SD mostrano un ritardo di maturazione nel lessico e nella sintassi, risultante, durante l'adolescenza e nell'età adulta, in capacità linguistiche molto ridotte. La comprensione linguistica è invece relativamente più avanzata della sintassi (Dykens et al., 1994; Chapman e Hesketh, 2000; Vicari, 2006).

*Capacità visuo-spaziali.* Gli individui con SD si esprimono in maniera significativamente più semplice rispetto agli individui di pari età mentale quando il materiale visuo-percettivo e le immagini devono essere elaborate. Tuttavia, quando l'operazione comporta l'elaborazione di dati spaziali, le prestazioni degli individui Down sono simili a quelle dei controlli (Vicari, 2006).

*Apprendimento e memoria.* Molti studi hanno dimostrato una compromissione della memoria verbale a breve termine e di quella esecutiva in individui con SD (Vicari, 2006). I processi automatici che richiedono attenzione fanno parte della memoria implicita, mentre la memoria esplicita si occupa di apprendimento volontario e richiede una codifica delle informazioni, strategie di recupero e un alto grado di attenzione. I bambini con SD hanno capacità di apprendimento normali per i compiti che coinvolgono la memoria implicita ma manifestano un indebolimento selettivo della memoria esplicita, con una scarsa codifica delle informazioni, una capacità di recupero ridotta e deficit dell'attenzione (Carlesimo et al., 1997;

Vicari et al., 2000). Inoltre, bambini e adulti affetti presentano gravi deficit nelle capacità di apprendimento ippocampo-specifiche e in quelle dipendenti dall'integrità del sistema prefrontale (Nadel, 2003).

*Disturbi neurocomportamentali.* La comorbidità di disturbi neurocomportamentali e psichiatrici in bambini con SD è stata stimata in un range che varia dal 18% al 38%. I disturbi neurocomportamentali nei bambini affetti possono includere un aumento dell'attività motoria e dell'impulsività, capricci, agitazione o ansia, movimenti ripetitivi, risposte sensoriali alterate, un'atipica processazione neurocognitiva e, raramente, disinteresse per l'interazione sociale (Capone, 2006). Ansia, depressione e asocialità cominciano ad essere evidenti sin dall'infanzia, e sono correlati positivamente con l'età (Chapman e Hesketh, 2000).

*Demenza precoce di tipo Alzheimer.* Una caratteristica peculiare della SD è l'elevato rischio di insorgenza della malattia di Alzheimer dopo i 35 anni di età. Negli adulti con SD possono essere individuate due fasi del declino cognitivo: la prima corrisponde ad un calo della performance cognitiva a causa di problemi nella formazione di nuovi ricordi a lungo termine; la seconda alla perdita delle memorie riguardanti i comportamenti appresi. Questi processi sono ritenuti dipendenti, nella prima fase, dall'accumulo di placche senili (come nella malattia di Alzheimer) e, nella seconda fase, da una marcata morte neuronale. La perdita della memoria visiva a breve termine è stata proposta come uno dei primi segni di demenza nella SD (Crapper-McLachlan, 1986).

#### **1.3.4 - Neuroanatomia della sindrome**

Il cervello di un individuo affetto da SD è caratterizzato da un telencefalo meno sviluppato in senso antero-posteriore, con riduzione dei lobi frontali, appiattimento dei poli occipitali e restringimento del giro temporale superiore (Schapiro et al., 1987; Schmidt-Sidor et al., 1990; Wisniewski, 1990; Becker et al, 1991; Weis et al, 1991; Raz et al, 1995; Pinter et al., 2001). Inoltre, gli individui con SD presentano una caratteristica riduzione del volume cerebrale. La riduzione più evidente si ha nelle regioni frontali, temporali e cerebellari, mentre le regioni parietali e occipitali sono relativamente conservate (Pinter et al., 2001). La riduzione delle dimensioni del cervello può essere fatta risalire ai primi stadi dello sviluppo, come un'ipotrofia delle strutture ippocampali e del cervelletto presente durante la gestazione (Winter et al., 2000; Guidi et al., 2008, 2011a). In individui con SD che non presentano demenza è stata riportata una riduzione del volume della materia grigia del cervelletto, del

giro dentato (GD), della parte mediale del lobo frontale sinistro, del giro temporale destro e dell'ippocampo sinistro (White et al., 2003). Inoltre, l'atrofia del corpo calloso è presente negli adolescenti con SD (Wang et al., 1992), mentre negli adulti non dementi è accompagnata dall'atrofia della commissura anteriore (Sylvester, 1986; Teipel et al., 2003). Una composizione biochimica difettosa della mielina ed un ritardo nella formazione della stessa (Banik et al., 1975; Shah, 1979; Wisniewski e Schmidt-Sidor, 1989; Becker et al., 1991; Koo et al., 1992) possono avere un ruolo chiave nel determinare questo particolare fenotipo a livello strutturale.

Per quanto riguarda la microstruttura cerebrale, la densità cellulare appare normale all'inizio della gestazione, ma il numero dei neuroni risulta minore alla fine della stessa (dopo 19-23 settimane); questa riduzione del numero cellulare prosegue per tutte le prime fasi della vita (Golden e Hyman, 1994; Weitzdoerfer et al., 2001; Guidi et al., 2008). Nei feti affetti, la laminazione della corteccia è ritardata e disorganizzata (Golden e Hyman, 1994), il numero totale dei neuroni nel GD e nel giro paraippocampale è ridotto (Guidi et al., 2008) e gli strati cellulari del cervelletto manifestano un'ipocellularità molto evidente (Guidi et al., 2011a). Studi morfometrici mostrano un numero ridotto di neuroni, una minore densità e una disgenesia corticale (Wisniewski, 1990). I bambini e gli adulti affetti sono caratterizzati da una ridotta densità di cellule dei granuli nel cervelletto (Baxter et al., 2000) e da un numero molto ridotto di neuroni nel nucleo cocleare ventrale (Gandolfi et al., 1981). Il cervello affetto da SD presenta anomalie citoarchitettiche e una riduzione significativa del numero di cellule granulari soprattutto nei campi 3, 17 e 41 (Ross et al., 1984).

Parallelamente al fenotipo neuronale, sono evidenti numerose alterazioni a carico delle cellule gliali. I feti con SD manifestano un aumento del rapporto astrociti-neuroni in tutte le strutture ippocampali (Guidi et al., 2008). L'ipertrofia astrocitaria e l'aumento nel numero degli astrociti possono essere riscontrati sia durante lo sviluppo che in un cervello adulto (Mito e Becker, 1993; Griffin et al., 1998). La microglia è molto più abbondante negli affetti e le disfunzioni degli oligodendrociti comportano un ritardo nella mielinizzazione nel lobo frontale e temporale (Becker et al., 1991).

La diffusa ipoplasia del cervello affetto da SD è considerata la principale causa di ritardo mentale. Diversi studi mostrano che la riduzione della neurogenesi e l'ipotrofia dendritica sono le due principali cause di ipotrofia nel cervello affetto; se un aumento della morte cellulare non sembra giocare un ruolo importante nelle prime fasi di vita, negli stadi più avanzati può contribuire all'ipotrofia cerebrale.

*Alterazioni della neurogenesi.* I neuroni e le cellule gliali, destinati a formare lo strato

corticale, derivano dalla zona ventricolare embrionale (ZV) (Brazel et al., 2003) e, nelle fasi più avanzate dell'embriogenesi, dalla zona subventricolare (ZSV). Dopo il periodo embrionale/post-natale la ZSV produce cellule granulari che migrano verso il bulbo olfattivo (Brazel et al., 2003). I neuroni che formano il GD derivano inizialmente dal neuroepitelio dentato che dà origine alla zona subgranulare (ZSG) (Altman e Bayer, 1990). I neuroni del cervelletto si formano prevalentemente prima della nascita, ad eccezione delle cellule granulari dello strato granulare interno che si formano sia prima della nascita che nel primo periodo postnatale a partire da precursori che si trovano nello strato granulare esterno (SGE) (Abraham et al., 2001; Sudarov e Joyner, 2007). Alterazioni della neurogenesi nella ZV, nella ZSV, nella ZSG e nello SGE sono ben documentati nel cervello affetto da SD.

Le informazioni riguardanti la neurogenesi durante lo sviluppo fetale del cervello affetto da SD sono molto ridotte per l'ovvia difficoltà nell'ottenere materiale fetale da analizzare. Di recente si è scoperto che la proliferazione cellulare nel GD è seriamente compromessa nel feto con SD (Contestabile et al., 2007; Guidi et al., 2008). Nei feti trisomici, è stata inoltre riscontrata una neurogenesi compromessa nello SGE del cervelletto e in una regione del quinto lobulo che è un residuo della ZV cerebellare (Guidi et al., 2011a).

*Morte cellulare e neurodegenerazione.* Neuroni in coltura provenienti dal cervello di un feto affetto mostrano un aumentato livello di apoptosi (Busciglio e Yankner, 1995; Busciglio et al., 2002; Pelsman et al., 2003; Helguera et al., 2005). Dall'autopsia di campioni di cervello sono emerse alterazioni dei geni antiapoptotici della famiglia bcl-2 nel lobo temporale (Sawa et al., 1997) e nell'ippocampo (Nagy e Esiri, 1997), insieme a livelli più alti delle proteine pro-apoptotiche p53 e CD95 nella corteccia cerebrale e nel cervelletto (De la Monte et al., 1998; Seidl et al., 1999). L'attivazione della caspasi-3 rappresenta uno step irreversibile nella cascata del processo apoptotico (Schulz et al., 1999). Nelle regioni ippocampali dei feti (Guidi et al., 2008) e nei cervelli di adulti con SD (Stadelmann et al., 1999) è stato osservato un aumento dell'immunoreattività dovuta all'attivazione della caspasi-3. D'altro canto, nel cervelletto e nella corteccia cerebrale dei feti affetti (Gulesserian et al., 2001; Guidi et al., 2011a) è stata osservata un'espressione normale di caspasi-3, suggerendo che i livelli più alti di apoptosi non rappresentino un fenomeno diffuso in egual misura nel cervello di un individuo affetto da SD.

Un cambiamento rilevante indotto dalla SD è la progressiva atrofia cerebrale età-dipendente, che è ritenuta derivare da patologie neurodegenerative di tipo Alzheimer. La presenza degli hallmarks tipici della malattia di Alzheimer nel cervello di individui con SD è rilevata dopo i 40 anni di età (Wisniewski et al., 1978) ed è caratterizzata da cambiamenti

progressivi che includono sia la comparsa di placche amiloidi diffuse sia la presenza di grovigli neurofibrillari, oltre a perdita di sinapsi e di neuroni soprattutto a carico dei sistemi colinergico e noradrenergico (Coyle et al., 1986). Come nella malattia di Alzheimer, la perdita dell'innervazione colinergica verso l'ippocampo e la corteccia è responsabile delle disfunzioni riguardanti l'attenzione e la memoria esplicita osservate all'insorgere della demenza nei pazienti con SD (Wisniewski et al., 1985a, b). La degenerazione dei neuroni noradrenergici del locus coeruleus è uno dei primi eventi nell'Alzheimer e nella SD e può contribuire alla neuropatologia (Mann et al., 1985). Inoltre, l'alterazione del metabolismo dei radicali liberi e delle funzioni mitocondriali è collegata alla degenerazione dei neuroni corticali (Busciglio e Yankner, 1995; Busciglio et al., 2002) e può essere associata sia al ritardo mentale che al quadro clinico Alzheimer-simile nei pazienti con SD. La proteina  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) è la maggior componente delle placche senili sia negli affetti da Alzheimer che negli affetti da SD ed è responsabile dell'induzione di apoptosi a seguito di stress ossidativo (Tamagno, 2003).

*Ipotrofia dendritica.* La patologia dendritica è una caratteristica peculiare della SD. I neuroni di un cervello affetto mostrano alterazioni evidenti nella forma dell'albero dendritico e delle spine dendritiche. I neuroni nella corteccia visiva dei feti (Takashima et al., 1981) e nella corteccia prefrontale di neonati di due mesi e mezzo (Vuksic et al., 2002) con SD non manifestano alterazioni a livello dendritico. Tuttavia, esse appaiono a partire dai 3-4 mesi di età. Dopo questo periodo di tempo, i bambini con SD mostrano ipotrofia dendritica nei neuroni della corteccia motoria (Prinz et al., 1997), della corteccia visiva (Takashima et al., 1981; Becker et al., 1986) e della corteccia parietale (Schulz e Scholz, 1992). L'ipotrofia dendritica prosegue nell'età adulta con una riduzione dell'arborizzazione e della lunghezza dei dendriti.

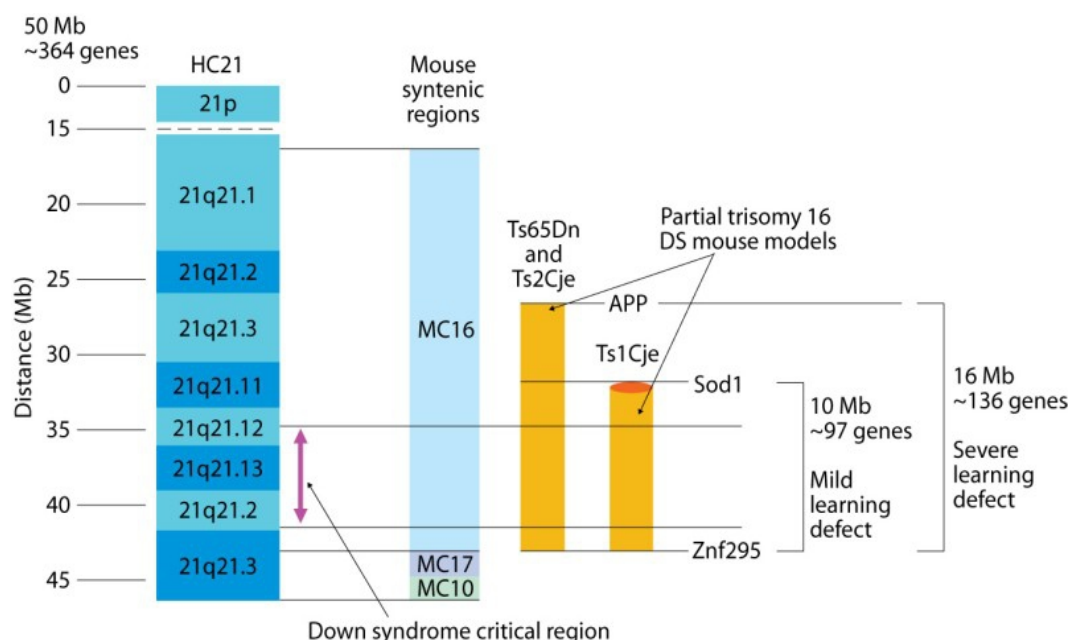
A livello molecolare l'espressione delle proteine che formano il citoscheletro neuronale e di quelle associate al reticolo endoplasmatico è fortemente down-regolata nei soggetti affetti da SD. Per quanto riguarda le spine dendritiche, se nel feto sono simili tra soggetti affetti e controlli, dopo la nascita nei SD cominciano a diminuire di numero ed a manifestare alterazioni morfologiche (Takashima et al., 1981). Nei soggetti sani il numero di spine dendritiche aumenta dalla nascita fino ai 15 anni di età, per poi decrescere dopo i 20 anni. Nei soggetti con SD, invece, il numero di spine aumenta pochissimo durante l'infanzia e decresce molto rapidamente (Suetsugu e Mehraein, 1980; Takashima et al., 1989, 1994). In particolare, nei soggetti affetti da SD è stata riscontrata una densità di spine ridotta nei dendriti apicali dei neuroni piramidali dell'ippocampo nei campi CA1 e CA2-3 (Suetsugu e Mehraein, 1980; Takashima et al., 1989, 1994). Infine, anche l'insorgenza della demenza di tipo Alzheimer

contribuisce alla riduzione delle spine dendritiche (Takashima et al., 1989; Ferrer e Gullotta, 1990), che presentano quindi alterazioni morfologiche caratteristiche (Marin-Padilla, 1976; Purpura, 1979).

#### 1.4 - Il modello murino della sindrome di Down: il topo Ts65Dn

Nell'uomo la sindrome di Down è il risultato diretto di una trisomia a carico del cromosoma 21 che sbilancia l'espressione genica di circa 250 geni. Alcuni di questi sono considerati i principali candidati per lo sviluppo del fenotipo Down. I loci di questi geni sono raggruppati tra loro sul cromosoma 21 ed identificano una regione che è stata nominata critica per la sindrome di Down (*Down Syndrome Critical Region* - DSCR) (Fig. 1.2) (Delebar et al., 1993). A livello genomico, il braccio lungo del Cr21 è formato da circa 33,7 Mb e contiene 430 geni, 239 dei quali hanno un omologo nel genoma murino. Questi geni sono localizzati su tre diversi cromosomi nel topo. Andando dal centromero verso il telomero del cromosoma 21 umano, la prima regione, che è anche la più estesa, si trova sul cromosoma 16 murino (Mu16), lungo circa 37 Mb con 224 geni ortologhi. La regione successiva del Cr21 si trova sul Mu17, che è lungo 1,1 Mb con 22 geni ortologhi. Invece, la regione terminale del Cr21 si trova sul Mu10, lungo 2,3 Mb con 47 geni ortologhi. In queste tre regioni l'ordine e l'orientamento relativo dei geni appare conservato fra le due specie.

Il primo modello murino di trisomia 21, generato da una traslocazione robertsoniana spontanea del Mu16, fu chiamato Ts16 (Gropp et al., 1975). Lo studio di tale modello è stato però fortemente limitato, poiché tali topi generalmente morivano in utero in tarda età gestazionale. Inoltre, la presenza di altre sintenie tra Mu16 e Cr3, Cr8, Cr16 e Cr21 mostrò il limitato valore sperimentale del modello.





*Fig. 1.2. Schema del cromosoma 21 umano in cui è evidenziata la DSCR. Nello schema viene mostrata l'omologia fra il cromosoma 21 umano ed il segmento aneuploide di alcuni modelli murini per la SD: Ts65Dn e Ts1Cje*

Nel mio lavoro di Tesi ho usato invece il modello di SD maggiormente studiato e accreditato: esso porta una parziale trisomia del Mu16 e prende il nome di Ts65Dn (Fig 1.2) (Davisson et al., 1993). La trisomia in questo modello si estende per circa 23,3 Mb tra i geni *Mrpl39* e *Znf295*, per un totale di 132 geni ortologi al Cr21 (Kahlem et al., 2004). Una caratterizzazione dettagliata del modello Ts65Dn ha rivelato un fenotipo anomalo simile a quello osservato nella trisomia 21 umana (Reeves et al., 1995; Escorihuela et al., 1998; Costa et al., 1999; Baxter et al., 2000; Richtsmeier et al., 2000; Cooper et al., 2001; Dierssen et al., 1997; Dierssen et al., 2003; Delcroix et al., 2004).

#### **1.4.1 - Disturbi comportamentali e cognitivi**

Rispetto ai topi WT, il topo Ts65Dn mostra una maggiore attività al buio (Reeves et al., 1995) e in open-field (Stewart, 2007). Inoltre, i topi Ts65Dn presentano numerosi deficit di sviluppo, per esempio a carico del pattern di vocalizzazione ultrasonica e nelle prestazioni in test di homing e di attività locomotoria in arene a spazio aperto (Holtzman et al., 1996). Anche le abilità motorie sono alterate, con anomalie nello schema d'appoggio delle zampe posteriori durante il cammino, nella velocità di corsa, nelle prestazioni al rotarod, nella forza prodotta durante una presa effettuata con le zampe anteriori e nel nuoto. I deficit più evidenti appaiono connessi con il coordinamento motorio e l'equilibrio, in accordo con le osservazioni cliniche effettuate su persone con SD (Costa et al., 1999). Inoltre, i topi Ts65Dn mostrano una tendenza alla stereotipizzazione dei comportamenti significativamente maggiore rispetto agli animali diploidi (Turner et al., 2001).

Test che permettono di valutare il comportamento sociale hanno messo in evidenza un aumento delle aggressioni offensive subite dai Ts65Dn adulti. Inoltre gli stessi animali mostrano comportamenti riproduttivi alterati, con bassa propensione nei maschi ad interagire con femmine estranee (Klein et al., 1996).

I deficit più marcati si riscontrano a carico dei compiti che richiedono l'integrità del sistema ippocampale, quali l'alternanza spontanea (T-maze task), la discriminazione

contestuale (fear-conditioning test) e la memoria spaziale (radial arm maze test) (Demas et al., 1996; Belichenko et al., 2007; Salehi et al., 2009; Bianchi et al., 2010b).

Studi di elettrofisiologia in vivo hanno documentato un'importante analogia dei topi Ts65Dn con i pazienti Down. Misurazioni di potenziali visivi evocati nella corteccia visiva di topi anestetizzati mostrano chiaramente deficit paragonabili a quelli di soggetti umani trisomici (Suttle et al., 2004; Suttle e Lloyd, 2005; Courage et al., 1994), con un abbassamento dell'acuità visiva e la necessità di una maggiore contrasto cromatico per la discriminazione degli stimoli.

#### **1.4.2 - Neuroanatomia**

Nei topi Ts65Dn il volume cerebrale è ridotto durante la vita embrionale ma raggiunge valori normali dopo la nascita (Holtzman et al., 1996; Aldridge et al., 2007; Chakrabarti et al., 2007). La forma degli emisferi è caratterizzata da un aumento dell'altezza nella parte posteriore del cervello, da una riduzione della lunghezza in senso rostrocaudale e da una diminuzione della larghezza in senso mediolaterale (Aldridge et al., 2007). Il volume complessivo dell'ippocampo e dello strato piramidale non sono ridotti (Holtzman et al., 1996; Insausti et al., 1998; Lorenzi e Reeves, 2006), anche se lo strato delle cellule dei granuli presenta ipotrofia (Lorenzi e Reeves, 2006; Contestabile et al., 2007; Bianchi et al., 2010b). A differenza del cervello, il cervelletto presenta dimensioni notevolmente ridotte (Aldridge et al., 2007).

Lo sviluppo della neocorteccia dei topi Ts16 è caratterizzato da un ritardo nell'espansione radiale e da una riduzione permanente del volume corticale (Haydar et al., 1996). Come i topi Ts16, i topi Ts65Dn manifestano un ritardo nell'espansione della neocorteccia durante il periodo embrionale, anche se questa differenza sparisce nel 18° giorno di vita embrionale (E18) (Chakrabarti et al., 2007). A E18, tuttavia, nonostante la normale crescita corticale in spessore, vi è una riduzione della densità cellulare. Questo fenomeno è presente anche a P8 (*post-natal day* 8), precisamente negli strati IV-VI (Chakrabarti et al., 2007). Analogamente alla corteccia, la parete ippocampale ha uno spessore ridotto che persiste fino a E18. Lo strato piramidale dell'ippocampo ha uno spessore ridotto e il GD è più piccolo (Chakrabarti et al., 2007). Il GD di topi Ts65Dn presenta meno cellule dei granuli in tutte le fasi della vita postnatale (Insausti et al., 1998; Lorenzi e Reeves, 2006; Contestabile et al., 2007; Bianchi et al., 2010b). Di contro, il numero di cellule piramidali non si riduce in età adulta (Lorenzi e Reeves, 2006) e nei topi Ts65Dn anziani il campo CA3 presenta più neuroni

rispetto ai controlli (Insausti et al., 1998). Nell'ippocampo di topi Ts65Dn gli astrociti presentano una ipertrofia significativa e sono più numerosi che nei controlli (Holtzman et al., 1996). Inoltre, gli strati del cervelletto di un topo Ts65Dn hanno uno spessore ridotto e un numero di cellule granulari che decresce già a partire da P2 (Baxter et al., 2000; Roper et al., 2006; Contestabile et al., 2009). Anche la densità delle cellule del Purkinje è ridotta (Baxter et al., 2000).

### **1.4.3 - L'inibizione cerebrale: un modello per il fenotipo dei topi Ts65Dn**

I topi Ts65Dn sono stati il primo modello murino della SD in cui è stata messa in evidenza la correlazione fra i livelli di inibizione intra-cerebrale e l'estrinsecarsi del fenotipo Down. Le abilità spaziali sono strettamente legate a fenomeni di plasticità sinaptica nella regione dell'ippocampo e i forti deficit di tali abilità si riflettono in un'alterazione delle risposte elettrofisiologiche nelle circuiterie ippocampali. RegISTRAZIONI di potenziali di campo post-sinaptici eccitatori (*field Excitatory PostSinaptic Potentials* - fEPSPs) evocati in fettine d'ippocampo dall'area CA1 di animali trisomici non risultano essere diverse rispetto alle misurazioni fatte su controlli WT, sia in topi anziani di 9 mesi sia in giovani adulti di 2 mesi (Siarey et al., 1997). Al contrario, misurazioni di fEPSPs nella stessa area mostrano un netto aumento del depotenziamento a lungo termine (LTD) in seguito a stimolazione a bassa frequenza (Siarey et al., 1999) e l'assenza di LTP in seguito ad una stimolazione ad alta frequenza (Siarey et al., 1997).

Un lavoro successivo ha messo in evidenza che l'assenza di LTP è in realtà un fenomeno dipendente dal tipo di stimolazione ad alta frequenza utilizzato (Costa e Grybko, 2005). Mentre stimolazioni di tipo theta (*Theta-Burst Stimulus* - TBS; ad es. 5 treni di 4 impulsi a 100 Hz e a distanza di 200ms l'uno dall'altro, con una durata individuale di 100 $\mu$ s) non inducono LTP, al contrario una stimolazione tetanica a 100 Hz (*High Frequency Stimulation* - HFS; ad es. 1 singolo treno a 100 Hz di impulsi dalla durata di 100 $\mu$ s) induce un LTP paragonabile a quello dei controlli non trisomici. L'LTP indotto da TBS è infatti più sensibile ai cambiamenti dei livelli di inibizione mediati dai recettori GABA<sub>A</sub> rispetto a quello indotto da HFS. L'aggiunta alla soluzione di registrazione di picrotossina, una molecola antagonista non competitiva per i recettori GABA<sub>A</sub>, ripristina i fenomeni di LTP nell'ippocampo dei topi Ts65Dn (Kleschevnikov et al., 2004; Costa e Grybko, 2005). Questa evidenza ha rappresentato la conferma del diretto coinvolgimento del sistema GABAergico nel malfunzionamento della plasticità sinaptica ippocampale dei TS65Dn. Anche l'analisi istologica ha confermato il coinvolgimento del

sistema GABAergico nelle alterazioni funzionali ippocampali dei topi Ts65Dn. Si osserva infatti, nella regione del giro dentato dell'ippocampo, una riduzione di densità delle spine che sinaptano sui dendriti delle cellule dei granuli, con una riorganizzazione degli input inibitori nella zona (Belichenko et al., 2002, 2004; Diersen et al., 2003; Kleschevnikov et al., 2004; Kurt et al., 2000, 2004). Inoltre, altri studi riportano alterazioni morfologiche quali la riduzione della densità delle cellule granulari e la riduzione della neurogenesi (Insausti et al., 1998; Rueda et al., 2005; Clark et al., 2006).

Anche la secrezione di  $\beta$ -amiloide nell'ippocampo è riconosciuta essere un fattore d'inibizione dell'LTP in quest'area (Walsh et al., 2002). Il gene che traduce per la proteina precursore del  $\beta$ -amiloide (app) è localizzato nella zona soggetta alla traslocazione T65Dn ed è quindi presente in triplice copia negli animali trisomici. Questo si riflette in un aumento dei livelli di APP nell'ippocampo osservabile nei topi Ts65Dn ad all'età di 12 mesi (Seo e Isacson, 2005). Inoltre, come conseguenza dell'aumento di APP, si ha una diminuzione della concentrazione di NGF nella stessa area (Hunter et al., 2003).

Uno studio recente sullo sviluppo dei topi Ts65Dn ha dimostrato che la triplicazione dei geni olig1 ed olig2 indotta dalla trisomia 16 segmentale è cruciale per la comparsa delle disfunzioni neuronali durante lo sviluppo del prosencefalo (Chakrabarti et al., 2010). Tale triplicazione induce nel prosencefalo uno sbilanciamento del rapporto tra neuroni eccitatori ed inibitori. Questi due geni controllano infatti la proliferazione cellulare di un'importante area di neurogenesi della parte ventrale del telencefalo, l'eminenza caudale ganglionale (CGE). L'aumento del dosaggio di olig1 ed olig2 è responsabile della sovrapproduzione di interneuroni inibitori nel CGE ed è, inoltre, causa della diminuzione di proliferazione delle cellule progenitrici della corteccia dorsale, del cervelletto e dell'ippocampo.

## **1.5 - Strategie terapeutiche per il trattamento della sindrome di Down**

L'identificazione e la comprensione dei meccanismi molecolari alla base delle anomalie finora descritte forniscono il punto di partenza per la ricerca di terapie che, andando ad agire su specifiche cascate cellulari, possano correggere i deficit degli individui affetti da SD. Sebbene numerosi gruppi di lavoro stiano cercando di svelare le cause del malfunzionamento cerebrale della SD, alcuni meccanismi molecolari restano tuttora ignoti. Tuttavia, sono emerse di recente alcune promettenti strategie capaci di alleviare i sintomi associati con la SD.

### **1.5.1 - Arricchimento ambientale e terapia nel topo Ts65Dn**

Alcuni gruppi di ricerca hanno iniziato ad indagare gli effetti dell'AA sul fenotipo dei topi Ts65Dn. Un primo studio ha analizzato le prestazioni comportamentali di topi Ts65Dn stabulati in condizione di AA (Martínez-Cué et al., 2002). I risultati mostrano che l'AA normalizza le prestazioni delle femmine Ts65Dn in compiti legati all'apprendimento spaziale e alla memoria, benché le prestazioni rimangano inferiori rispetto a quelle del gruppo di controllo euploide. Risultati opposti sono stati osservati nel gruppo dei maschi Ts65Dn, per i quali l'AA sembra avere un effetto deteriorante sulle prestazioni comportamentali, che peggiorano rispetto a quelle dei fratelli trisomici non arricchiti. In entrambi i sessi, invece, l'AA aumenta l'esplorazione rispetto ai controlli non arricchiti, anche se l'effetto è più marcato e persistente nelle femmine. È interessante notare che misurazioni dell'attività motoria notturna hanno messo in evidenza un aumento dell'attività nel gruppo di femmine in arricchimento rispetto alle sorelle non arricchite; viceversa, nel gruppo dei maschi arricchiti è stata riscontrata una diminuzione dell'attività rispetto ai controlli allevati in condizioni standard. L'analisi dei dati ricavati da metodiche che analizzano la memoria procedurale ha messo in evidenza situazioni analoghe alle precedenti: le femmine trisomiche arricchite mostrano, infatti, un miglioramento delle prestazioni, mentre i maschi evidenziano prestazioni inferiori al gruppo di controllo trisomico non arricchito (Martínez-Cué et al., 2002). È importante sottolineare che in questo studio il gruppo dei topi Ts65Dn è stato stabulato assieme ai fratelli euploidi. Questa condizione può risultare stressante per i topi Ts65Dn, che sovente si trovano in condizioni di subordinazione rispetto ai fratelli euploidi.

A conferma di ciò, nel 2005 la stessa équipe di ricerca, sfruttando un test comportamentale per la valutazione delle dominanze gerarchiche (Haemish et al., 1994), ha evidenziato che i topi Ts65Dn difficilmente rivestono ruoli di dominanza, tendendo invece ad avere ruoli di completo subordine o di sotto-dominanza. La dinamica si accentua all'aumentare del numero di topi stabulati nella stessa gabbia, favorendo conseguentemente la proliferazione di comportamenti aggressivi. Inoltre, analisi biochimiche hanno mostrato che i livelli ematici di corticosterone tendono ad aumentare in diretta relazione al numero di animali stabulati assieme. Non è stata invece notata alcuna rilevante differenza fra i vari gruppi nei livelli di testosterone e dell'ormone adrenocorticotropo. Nello stesso lavoro i risultati dei test che analizzano la memoria spaziale hanno evidenziato che i Ts65Dn hanno prestazioni inferiori rispetto ai fratelli euploidi sottoposti alla medesima condizione di

stabulazione. Infine, test comportamentali che valutano i comportamenti d'ansia, come il T-maze elevato, non hanno messo in luce nessuna particolare differenza fra i diversi gruppi sperimentali (Martínez-Cué et al., 2005).

Recentemente uno studio ha messo in evidenza che protocolli di attività fisica volontaria applicati su topi Ts65dn di età compresa tra i 10 ed i 12 mesi e protratti per un periodo di 7 settimane non sono sufficienti per indurre una normalizzazione della neurogenesi a livello del giro dentato dell'ippocampo e, quindi, per un conseguente recupero della memoria e dell'apprendimento spaziale testati con il paradigma del labirinto ad acqua di Morris (*Morris Water Maze - MWM*) (Rueda et al., 2010).

### **1.5.2 - Strategie farmacologiche**

Lo studio dei meccanismi molecolari alla base dell'influenza dell'AA sul comportamento ha il promettente obiettivo di promuovere la scoperta di molecole (i cosiddetti *enviromimetics*) che potrebbero essere sfruttate per riprodurre gli effetti benefici dell'AA.

Alcuni autori hanno messo in evidenza che un trattamento cronico con estrogeni sui Ts65Dn recupera i deficit a carico dei marcatori dendritici e colinergici e nella formazione dell'ippocampo (Granholm et al., 2002, 2003). Lo stesso gruppo di ricerca ha anche scoperto che tale trattamento provoca un recupero dei deficit cognitivi legati all'apprendimento spaziale ed incrementa i livelli di NGF e dei marcatori colinergici alla base del prosencefalo, impedendo la perdita dei neuroni colinergici alla base del prosencefalo (*Basal Forebrain Cholinergic Neurons - BFCNs*) (Granholm et al., 2002). Altri studi hanno riportato che pure la somministrazione cronica di fisostigmina, un inibitore reversibile dell'enzima acetilcolinesterasi, recupera completamente i deficit di memoria legati alla degenerazione dei BFCNs nei topi Ts65Dn di 4 mesi di età; al contrario, lo stesso trattamento non ha effetto su animali più vecchi (Chang e Gold, 2008).

Recentemente è stato dimostrato che la somministrazione cronica di antagonisti GABAergici non competitivi recupera i deficit cognitivi nei topi trisomici (Fernandez et al., 2007). Nello specifico, due settimane di trattamento giornaliero con picrotossina, bilobalide o pentilentetrazolo (PTZ), a dosi non epilettogeniche, recuperano i deficit cognitivi propri dei topi Ts65Dn, riportando le prestazioni nei test comportamentali su livelli paragonabili ai WT. Inoltre è stato osservato che il recupero dei deficit si estende oltre il periodo della finestra di effetto degli psicofarmaci somministrati. Misurazioni elettrofisiologiche negli stessi animali

hanno mostrato un pieno recupero per quanto riguarda la possibilità di indurre LTP a seguito di TBS anche nelle due settimane successive alla fine del trattamento farmacologico.

Questi risultati trovano conferma in uno studio successivo (Rueda et al., 2008) nel quale sono stati analizzati gli effetti della somministrazione cronica di PTZ e Donepezil (DPZ) in topi Ts65Dn al quarto mese di vita. La somministrazione cronica di PTZ normalizza le prestazioni in test cognitivi come il MWM, inducendo però un'alterazione dell'equilibrio rispetto ai controlli Ts65Dn non trattati. Al contrario la somministrazione cronica di DPZ, un inibitore dell'acetilcolinesterasi (enzima adibito alla degradazione del neurotrasmettitore ACh nel vallo sinaptico), non ha alcun effetto sui topi Ts65Dn. È interessante notare che il trattamento clinico con DPZ induce miglioramenti cognitivi in soggetti umani affetti sia da SD (Heller et al., 2004; Kishnani et al., 2004) che da AD (Kaduszkiewicz et al., 2005).

In sostanza, un grandissimo numero di geni cambia la propria espressione in risposta all'AA. Fra questi, molti sono coinvolti nella struttura neuronale, nella trasmissione sinaptica, nell'eccitabilità neuronale e nella neuroprotezione (Rampon et al., 2000; Keyvani et al., 2004). Tra i geni presenti in triplice copia a causa della triplicazione della DSCR1, alcuni di essi riducono l'attività della calcineurina, una fosfatasi che controlla i recettori per N-methyl-D-aspartato (NMDAr), riducendone il tempo di apertura e, di conseguenza, l'efflusso di ioni K<sup>+</sup> dalla cellula. Iniezioni settimanali di nemantina (conosciuta anche come MK-801), un antagonista non competitivo per i NMDAr, su topi trisomici adulti porta alla normalizzazione delle prestazioni psicomotorie sia in arene a campo aperto che in test di condizionamento alla paura (Costa et al., 2008).

In un recente studio Rueda e collaboratori hanno riportato che la somministrazione cronica prenatale e postnatale di SGS-111, un farmaco neuroprotettivo con proprietà antiossidanti di cui è conosciuta l'efficacia su culture cellulari di neuroni provenienti da pazienti affetti da SD (Pelsman et al., 2003), riduce l'iperattività ed i comportamenti d'ansia nei topi Ts65Dn ma non recupera i deficit cognitivi e di apprendimento (Rueda et al. 2008).

Un gruppo di molecole particolarmente sensibili agli stimoli ambientali sono le neurotrofine (Pham et al., 2002), una classe di fattori di crescita fortemente coinvolti nella plasticità strutturale e funzionale sia durante lo sviluppo che nell'adulto (Berardi et al., 2003). La degenerazione dei neuroni colinergici del proencefalo basale (con relativa perdita di attività acetilcolinesterasica) nel cervello dei topi Ts65Dn può essere recuperata tramite infusione diretta di NGF nel prosencefalo (Cooper et al., 2001). In maniera analoga, l'assunzione cronica di BDNF per i primi 15 giorni dalla nascita, periodo in cui tipicamente appaiono le prime anomalie comportamentali, normalizza le prestazioni dei topi trisomici in

compiti che richiedono l'utilizzo della memoria (Fukuda et al., 2010).

Il trattamento con inibitori della  $\gamma$ -secretasi, un enzima responsabile del processamento del precursore della proteina A $\beta$ , diminuisce i livelli di A $\beta$  nell'ippocampo ed induce un recupero dei deficit di apprendimento nei topi Ts65Dn (Netzer et al., 2010).

Sono sempre maggiori i risultati che indicano i farmaci antidepressivi come capaci di riattivare la neurogenesi e aumentare la maturazione neuronale in modelli animali di depressione e ansia, sintomi presenti anche nella SD (Wang et al., 2008). La fluoxetina, un inibitore selettivo della ricaptazione della serotonina (SSRIs) e che quindi induce un aumento dei livelli extracellulari di serotonina, è un farmaco spesso prescritto per il trattamento dei disturbi depressivi. Recenti studi hanno evidenziato che gli effetti benefici della fluoxetina nei casi di lesioni cerebrali e patologie neurodegenerative non si limitano alla remissione dei sintomi depressivi, ma si estendono al miglioramento del deterioramento funzionale e neurologico (Chollet et al., 2011; Cirrito et al., 2011). Numerosi lavori hanno dimostrato che gli SSRIs sono in grado di indurre modificazioni funzionali dei circuiti neuronali, stimolando l'apprendimento e la memoria, la neurogenesi ippocampale, la sinaptogenesi e la plasticità nel cervello adulto (Malberg et al., 2000; Maya Vetencourt et al., 2008). Dal momento che una perturbazione dei processi di plasticità sembra essere coinvolta in maniera critica nell'eziogenesi della SD, il grande potenziale della fluoxetina di promuovere la plasticità neuronale rende questo trattamento appropriato per l'applicazione nel campo della terapia della SD.

Alcuni studi hanno dimostrato che il trattamento con fluoxetina è in grado di incrementare l'espressione di BDNF (Clark et al., 2006; Bianchi et al., 2006) e di stimolare la neurogenesi a livello dell'ippocampo, ristabilendo livelli simili a quelli dei controlli euploidi (Clark et al., 2006). Effetti benefici del trattamento sono stati registrati anche in topi Ts65Dn di un anno di età (Bianchi et al., 2010b). Altri autori (Maya Vetencourt et al., 2008) hanno riportato che un trattamento con fluoxetina di 4 settimane induce, nel ratto adulto, un completo recupero della plasticità in risposta a deprivazione monoculare e che tale effetto è associato ad una marcata riduzione dell'inibizione GABAergica (Maya Vetencourt et al., 2008). Oltre all'effetto sulla neurogenesi, il trattamento con fluoxetina permette il recupero totale della maturazione dendritica nei topi Ts65Dn (Guidi et al., 2011b). Come detto in precedenza, la SD è caratterizzata da difetti della maturazione dendritica e il trattamento con farmaci in grado di permettere il recupero di questo processo può portare ad un miglioramento, se somministrati nelle prime fasi della vita. Tuttavia, dal momento che i dendriti e le sinapsi mantengono un certo grado di plasticità durante l'arco della vita, la somministrazione della



terapia in stadi della vita successivi può avere comunque un effetto positivo sulla connettività e sull'architettura dell'albero dendritico.

Nonostante questi risultati siano promettenti, si sa molto poco riguardo al possibile impatto della fluoxetina a livello delle capacità cognitive e sensoriali e nella funzionalità neuronale nell'ippocampo e nella corteccia cerebrale di modelli murini di SD.

## **1.6 - Scopo della tesi**

Nel corso degli anni la ricerca scientifica ha prodotto numerose evidenze sperimentali a sostegno della tesi che identifica l'eccessivo livello di inibizione cerebrale come la causa della maggior parte dei sintomi della SD (Fernandez e Garner, 2007). Di conseguenza, la messa a punto di strategie capaci di ridurre il tono GABAergico potrebbe avere grande valore terapeutico per il trattamento della sindrome di Down. Come già menzionato, i recenti risultati dell'Istituto di Neuroscienze del CNR mostrano che due trattamenti non invasivi, l'AA e la somministrazione cronica di fluoxetina, risultano particolarmente efficaci nel promuovere la plasticità cerebrale mediante una riduzione dei livelli di inibizione cerebrale (Sale et al., 2007; Maya-Vetencourt et al., 2008).

Partendo da questa base, la presente Tesi di Laurea si è articolata in due sezioni sperimentali principali. Inizialmente ho cercato di individuare un dosaggio del farmaco che minimizzasse i possibili effetti collaterali. Successivamente, ho effettuato un trattamento cronico di 8 settimane con fluoxetina somministrata nell'acqua da bere, valutandone gli effetti sul fenotipo di topi Ts65Dn e topi euploidi di controllo in termini di prestazioni mnemoniche in un compito di memoria spaziale e livelli di plasticità sinaptica ippocampale a lungo termine.

## 2 - MATERIALI E METODI

Tutte le procedure impiegate in questo studio sono state approvate dal Ministero della Salute Pubblica.

### 2.1 - Animali e stabulazione

Topi con trisomia di un segmento del cromosoma 16 Ts65Dn (Stock Number: 005252) e Wt di età superiore a 60 giorni dalla nascita (P60) sono stati acquistati dai Jax Laboratories (Jax West Laboratories, Davis, CA) e stabulati in gabbie di plexiglass, posti ad un ciclo luce-buio di 12 ore. Sono stati fatti acclimatare a queste condizioni per almeno una settimana prima di essere inseriti nello studio.

Per l'intera durata della ricerca I topi sono stati mantenuti nelle normali condizioni di stabulazione: gabbia da laboratorio standard (26X42X18 cm) contenente o da 2 a 4 femmine o un unico maschio, facendo attenzione a mantenere gli animali trisomici e I Wt in gabbie separate. Cibo e acqua erano disponibili *at libitum*.

### 2.2 - Trattamento farmacologico

Animali Ts65Dn e Wt di entrambi i generi sono stati trattati con fluoxetina (Fluoxetine-Hydrochloride, Galeno, Prato, Italy) disciolta in acqua e somministrata tramite i beverini presenti nelle gabbie per 8 settimane; i soggetti di controllo di entrambi i generi e di entrambi i genotipi sono stati invece forniti di normale acqua. Per tutti i gruppi sperimentali il contenuto del beverino è stato cambiato due volte a settimana.

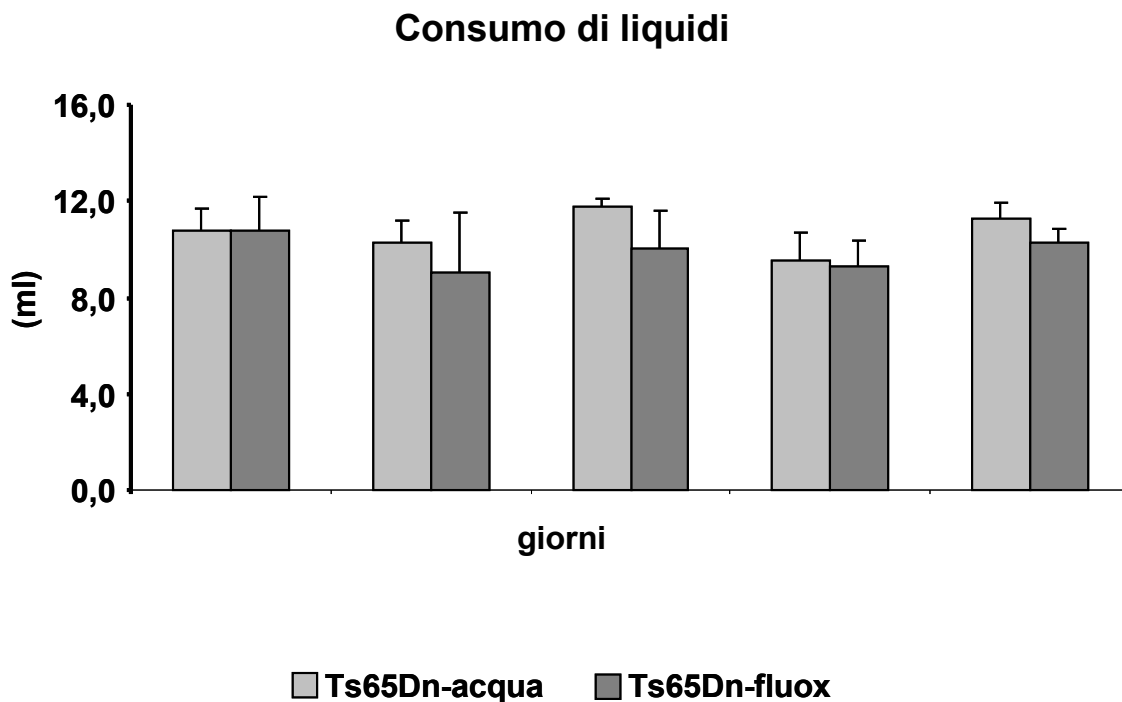
In uno studio preliminare, volto ad ottimizzare la dose di fluoxetina, sono state utilizzate tre dosi di farmaco a concentrazione decrescente: 40, 20 e 10 mg/Kg/die (Rantamaki et al., 2007; Maya Vetencourt et al., 2008; Karpova et al., 2011), corrispondenti, rispettivamente, a soluzioni di concentrazione pari a 0.10, 0.05 e 0.025 mg/ml. Sono quindi stati monitorate, per l'intera durata del trattamento, la sopravvivenza degli animali e la comparsa di crisi di tipo epilettico, valutate tramite osservazioni comportamentali (due sessioni di osservazione a settimana della durata di 60 minuti ciascuno, per tutte e 8 le settimane di trattamento farmacologico). Sono stati quindi analizzati i seguenti gruppi sperimentali: Ts65Dn-Flx40; Ts65Dn-Flx20; Ts65Dn-Flx10; Ts65Dn-acqua; Wt-flx40; Wt-flx20; Wt-flx10; Wt-acqua.

Per controllare l'assunzione del farmaco, è stata misurata la quantità di acqua pura o di acqua addizionata con fluoxetina (0,025mg/ml) assunta da topi Ts65Dn in cinque giorni consecutivi (Fig. 2.1 a). Non è stata riscontrata nessuna differenza statisticamente significativa tra gli individui (Ts65Dn-acqua, n = 4, I g:  $10.8 \pm 0.9$  ml, II g:  $10.3 \pm 0.9$  ml, III g  $11.8 \pm 0.3$  ml, IV g:  $9.5 \pm 1.2$  ml, V g:  $11.3 \pm 0.6$  ml; Ts65Dn-fluox, n = 4, I g:  $10.8 \pm 1.4$  ml, II g:  $9.0 \pm 2.5$  ml, III g  $10.0 \pm 1.6$  ml, IV g:  $9.3 \pm 1.1$  ml, V g:  $10.3 \pm 0.6$  ml) (RM ANOVA a due vie,  $p = 0.537$ )

Inoltre, non è stato riscontrata differenza statisticamente significativa nel peso dei due gruppi di animali (Ts65Dn-acqua:  $22.50 \pm 1.02$ g; Ts65Dn-flx:  $23.01 \pm 0.39$ g; t-test,  $p = 0.653$ ) (Fig. 2.1 b).

Pertanto, l'utilizzo di una soluzione di fluoxetina alla concentrazione di 0,025mg/ml è risultato in un dosaggio del farmaco piuttosto consistente tra i diversi individui trattati, con una media di  $0,26 \pm 0,02$  g al giorno.

a



b

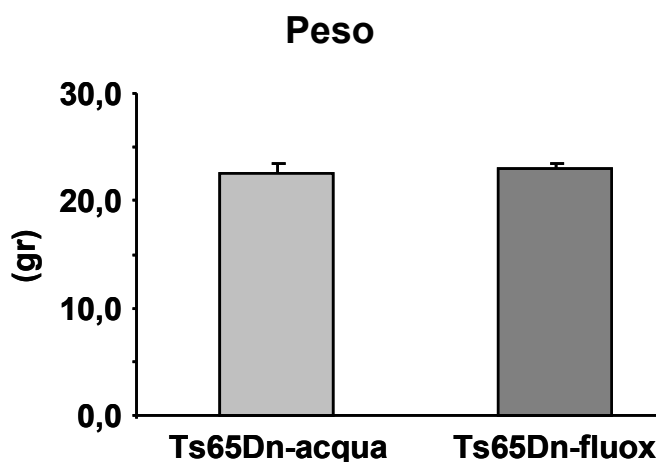


Fig. 2.1. (a) Non è stata riscontrata nessuna differenza statisticamente significativa tra gli individui (Ts65Dn-acqua,  $n = 4$ , I g:  $10.8 \pm 0.9$  ml, II g:  $10.3 \pm 0.9$  ml, III g  $11.8 \pm 0.3$  ml, IV g:  $9.5 \pm 1.2$  ml, V g:  $11.3 \pm 0.6$  ml; Ts65Dn-fluox,  $n = 4$ , I g:  $10.8 \pm 1.4$  ml, II g:  $9.0 \pm 2.5$  ml, III g  $10.0 \pm 1.6$  ml, IV g:  $9.3 \pm 1.1$  ml, V g:  $10.3 \pm 0.6$  ml) (RM ANOVA a due vie,  $p = 0.537$ )

(b) non è stata riscontrata differenza statisticamente significativa nel peso dei due gruppi di animali (Ts65Dn-acqua:  $22.50 \pm 1.02$ g; Ts65Dn-flx:  $23.01 \pm 0.39$ g; t-test,  $p = 0.653$ )

### 2.3 – Morris Water Maze

I topi sono stati allenati due volte al giorno, per un totale di 10 giorni, in una vasca circolare (100 cm di diametro, 40 cm di altezza) di polipropilene grigio, riempita ad una profondità di 25cm con acqua (23°C) resa opaca dall'aggiunta di una piccola quantità di vernice bianca atossica. Lungo il perimetro della vasca sono state stabilite 4 posizioni Nord (N), Sud (S), Ovest (O) ed Est (E), che sono servite come stazioni di partenza e per definire la divisione della vasca in 4 quadranti: NE, SE, SO, e NO (Fig. 2.2). Per evitare i possibili errori dovuti alla ridotta acuità visiva che caratterizza il ceppo Ts65Dn, la vasca è stata circondata da una serie di stimoli visivi esterni, tutti all'interno del range di discriminazione visiva dei vari gruppi sperimentali. Una piattaforma di uscita, circolare (10cm di diametro, 2cm di altezza) è stata posizionata al centro di uno dei quadranti e sommersa per 0,5cm. La piattaforma nascosta è rimasta sempre nello stesso quadrante durante l'apprendimento, mentre le posizioni di partenza (N, S, O, E) sono state cambiate in maniera casuale nei vari *trials*. Ai topi è stato permesso di rintracciare la piattaforma di uscita per un tempo di 60s al massimo, la latenza entro cui riuscivano a localizzare la piattaforma è stato registrato automaticamente dal software Noldus Ethovision. Nel secondo ingresso dell'ultimo giorno di esperimento la piattaforma di uscita è stata tolta dalla vasca e ai topi è stato permesso di nuotare per 60s alla ricerca della piattaforma scomparsa (*probe test*). Il percorso compiuto è stato registrato e analizzato con il software Noldus Ethovision.

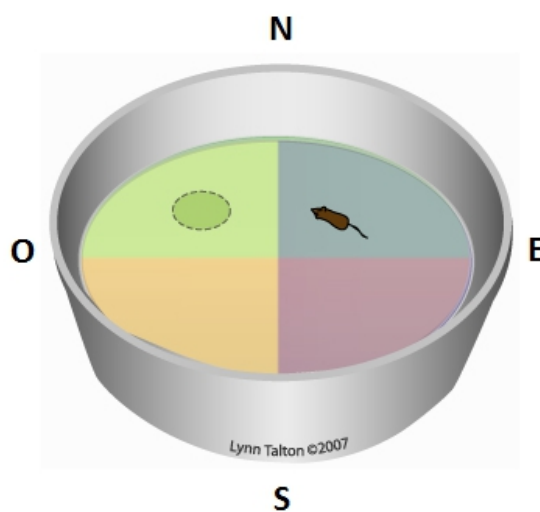


Fig. 2.2. Schema pittorico del Morris Water Maze

## 2.4 - Novel Place Recognition task

Gli animali sono stati fatti abituare ad un'arena rettangolare di Plexiglas (30 x 22 x 20 cm) per dieci minuti per due giorni consecutivi in condizioni di luce attenuata. L'attività degli animali è stata registrata con una videocamera. L'esperimento consta di due fasi: la fase di acquisizione e la fase di test vero e proprio (Fig. 2.3).

Per la fase di acquisizione, due oggetti identici sono stati posizionati nei due angoli consecutivi presenti sul lato lungo dell'arena, a 2-3 cm di distanza dalle pareti. L'animale è stato introdotto nell'arena in un punto equidistante dai due oggetti. Dopo dieci minuti di esplorazione, l'animale è stato riposto nella propria gabbia.

Il test è stato effettuato dieci minuti dopo la fase di acquisizione. Nella fase di test, della durata di tre minuti, uno dei due oggetti è stato spostato in una nuova posizione, precisamente al centro dell'arena, mentre la posizione dell'altro oggetto è rimasta invariata.

L'indice di discriminazione è stato calcolato come:

$$R(\%) = T_{\text{nuovo}} * 100\% / (T_{\text{nuovo}} + T_{\text{fisso}}),$$

dove per  $T_{\text{nuovo}}$  si intende il tempo trascorso ad esplorare l'oggetto spostato e per  $T_{\text{fisso}}$  il tempo trascorso ad esplorare l'oggetto rimasto nella posizione originaria.

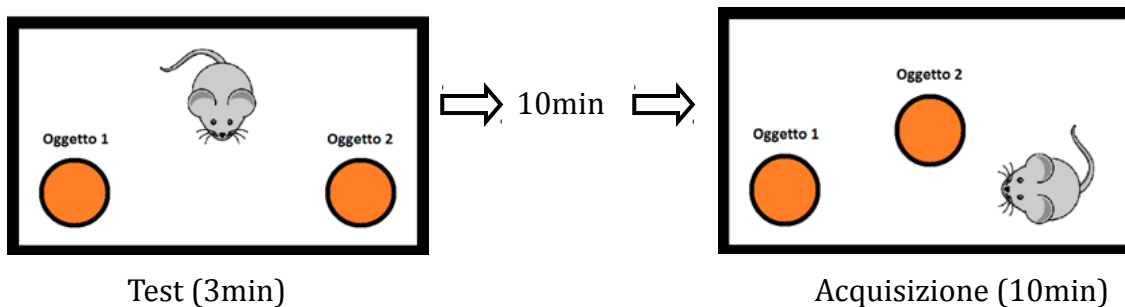


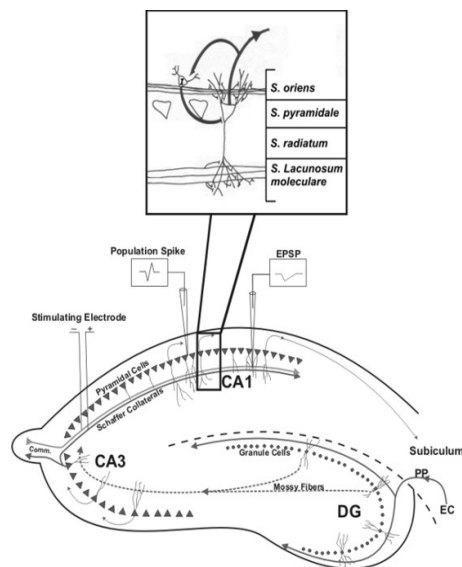
Fig. 2.3. Rappresentazione pittorica del protocollo del Novel Place Recognition

## 2.5 - Registrazioni elettrofisiologiche *in vitro*: misura dei livelli di LTP

A seguito di decapitazione, i cervelli degli animali sono stati rapidamente rimossi e posti in una soluzione di taglio (cutting) contenente (in mM): 130 NaCl, 3.1 KCl, 1.0  $K_2HPO_4$ , 4.0  $NaHCO_3$ , 5.0 destrosio, 2.0  $MgCl_2$ , 1.0  $CaCl_2$ , 10 HEPES, 1.0 acido ascorbico, 0.5 mio inositolo, 2.0 acido piruvico, e 1.0 acido chinurenico, pH 7.3.

Dopo isolamento tramite pinzette chirurgiche di entrambi gli ippocampi, sono state ottenute fettine trasversali di 400  $\mu\text{m}$  di diametro, mediante l'utilizzo di un chopper. Le fettine (n=7 fettine da 4 animali per i Wt-acqua; n=8 fettine da 5 animali per i Wt-flx; n=9 fettine da 4 animali per i Ts65Dn-flx e n=9 fettine da 4 animali per i Ts65Dn-acqua) sono state lasciate riposare per circa un'ora a e mezza fino a riequilibrarsi con la temperatura della stanza prima di essere spostate nella camera di registrazione, dove erano bagnate da una soluzione "recording", ossigenata e mantenuta alla T di 30°C; tale soluzione differiva dalla cutting per i dettagli seguenti (in mM): 1.0 MgCl<sub>2</sub>, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 0.01 glicina senza acido chinurenico.

Per le registrazioni, è stata applicata una stimolazione elettrica (durata 100ms) fornita mediante un elettrodo bipolare concentrico (FHC, St. Bowdoinham, ME) posto nella regione delle collaterali di Schaffer. I potenziali di campo post-sinaptici eccitatori (fEPSP) sono stati registrati con una micropipetta in vetro (1-3 M $\Omega$ ) tirata al puller e riempita con la soluzione di "recording", posizionata nello strato radiato del campo CA1 (Fig. 2.4).



*Fig 2.4. Circuiteria interna di ippocampo e posizionamento degli elettrodi*

Per ciascuna fettina è stata in primo luogo registrata l'ampiezza dei fEPSP ottenuti a seguito di stimolazioni di intensità crescente (curva input/output, curva I/O). Sulla base della curva I/O, è stata selezionata un'intensità di stimolazione capace di evocare risposte pari a circa il 50% del valore di saturazione. Mediante stimoli di questa intensità è stata quindi ottenuta una baseline, con stimolazioni intervallate da 30 secondi. Dopo aver registrato una baseline di stabilità adeguata (definita come una baseline composta da risposte comprese entro il 10% di variazione rispetto alla media e senza nessun evidente trend di crescita o

decrescita) per almeno 10 minuti, il potenziamento a lungo termine (LTP) è stato indotto per mezzo di una singola stimolazione di tipo TBS (4 treni di 10 scariche, con una frequenza di 5Hz, intervallati 15 secondi l'uno dall'altro; ciascuna scarica era composta da 4 stimoli di 100 Hz della durata di 1ms), applicata mediante l'elettrodo stimolante.

Le registrazioni di campo sono state filtrate e digitalizzate con l'ausilio una scheda analogico/digitale (National Instruments), interfacciata con uno specifico software di acquisizione, realizzato dal personale tecnico dell'Istituto di Neuroscienze del CNR di Pisa.

I grafici di LTP sono stati generati interpolando le ampiezze medie degli fEPSP in intervalli di 2 minuti, ed esprimendo le risposte come percentuale della baseline registrata precedentemente all'induzione del potenziamento a lungo termine. Il potenziamento degli fEPSP di ciascun gruppo è stato valutato comparando i 20 minuti di registrazione post-TBS con i valori di baseline.



## 3 - RISULTATI

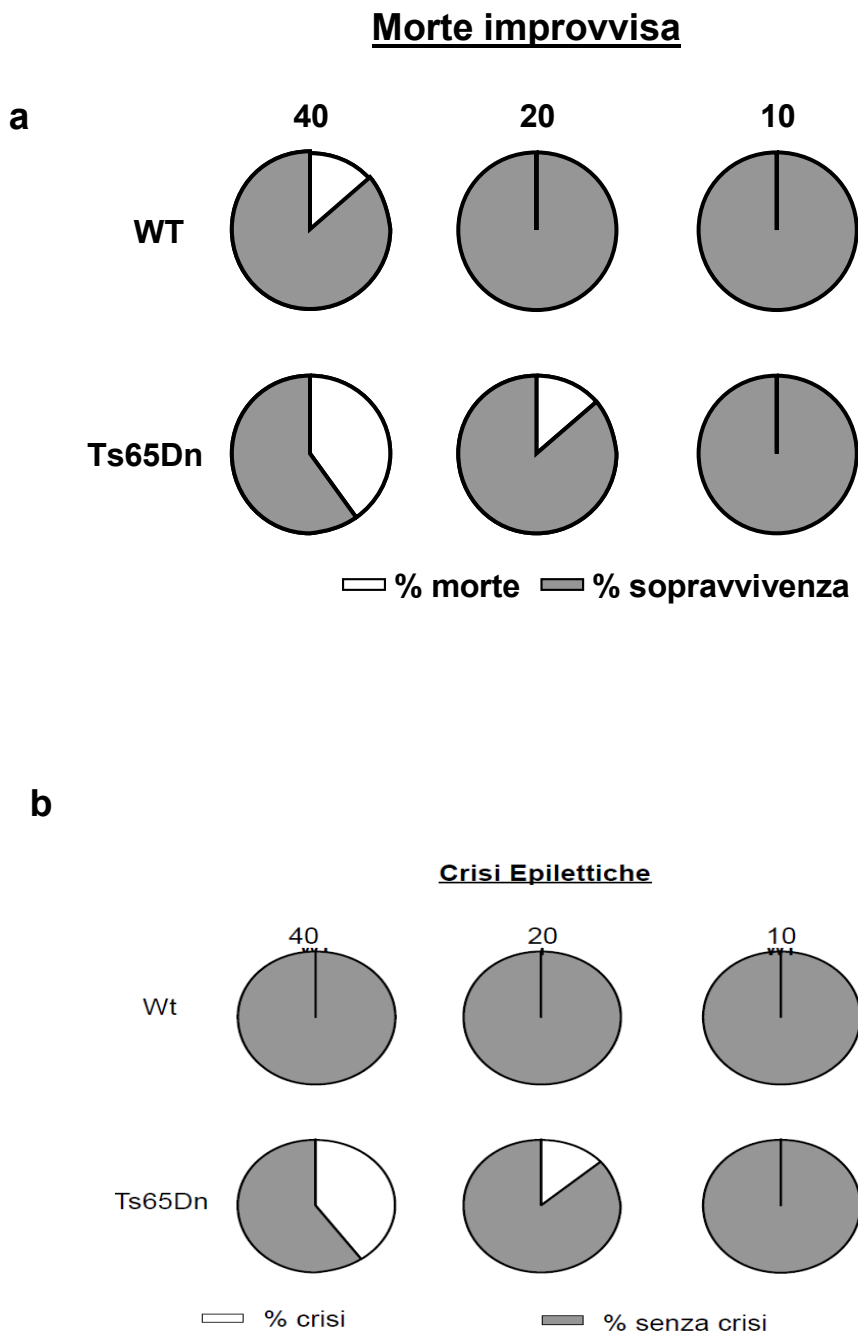
### 3.1 - Valutazione degli effetti pro-convulsivanti della fluoxetina

In studi precedenti su modelli animali era stata riscontrata un'azione pro-convulsivante della fluoxetina (Zienowicz et al., 2005; Heinen et al., 2012), in accordo col fatto che, anche nell'uomo, è possibile associare la comparsa di crisi epilettiche ad alti dosaggi del farmaco (Rosenstein et al., 1993; Oke et al., 2001; Suchard, 2008).

Pertanto, la presente ricerca è iniziata con mediante uno studio volto a valutare la comparsa di eventuali effetti collaterali gravi in animali trattati con fluoxetina somministrata a vari dosaggi. In particolare, sono stati valutati gli effetti di tre dosaggi decrescenti tra quelli tipicamente usati nei roditori di laboratorio: 40, 20 e 10 mg/kg/die. Tali dosaggi sono stati valutati sia in topi trisomici sia in animali Wt. Per tutta la durata del trattamento (8 settimane), sono state monitorate sia la sopravvivenza degli animali sia la suscettibilità a crisi convulsive, valutate mediante osservazioni comportamentali.

Nei topi Wt è stato registrato un solo caso di morte (1 su 7), riscontrato nel gruppo trattato al massimo dosaggio di fluoxetina. Tra i Wt non è mai stato riscontrato alcun caso di crisi tonico clonica. Nei topi trisomici, 4 animali su 10 del gruppo Ts65Dn-flx40 e 1 animale su 7 del gruppo Ts65Dn-flx20 sono morti nel corso delle 8 settimane di osservazione. Non sono invece stati riscontrati decessi improvvisi tra gli animali Ts65Dn-flx10 (0 su 8) né tra i controlli, sia Wt-acqua (0 su 9) che Ts65dn-acqua (0 su 7). Crisi di tipo tonico clonico sono state invece frequentemente osservate nei soggetti Ts65Dn saggiati ai due dosaggi più alti del farmaco, nei Ts65Dn-flx40 (4 su 10) e nei Ts65Dn-flx20 (1 su 7), mentre nessun caso è stato registrato nel gruppo dei soggetti trisomici saggiati al dosaggio più basso (0 su 8).

Questi risultati suggeriscono che la fluoxetina al dosaggio di 10mg/Kg/die non sia associata a casi di morte improvvisa e non abbia effetti pro-convulsivanti nel ceppo Ts65Dn. Pertanto, nel corso degli esperimenti successivi tutti gli animali sono stati trattati con questo dosaggio, allo scopo di valutarne gli effetti sul fenotipo dei topi euploidi e su quello dei soggetti trisomici.



*Fig. 3.1. Il grafico riporta la percentuale di morti improvvise (a) e di crisi epilettiche (b) nei quattro gruppi sperimentali di topi trattati con diversi dosaggi di fluoxetina. In entrambe le analisi non sono state riscontrati effetti collaterali negli animali trattati per 8 settimane con 10/mg/Kg/die di farmaco.*

### 3.2 – Studio della memoria spaziale mediante il Morris Water Maze.

L'analisi dei dati mostra come la latenza nel trovare la piattaforma il nono giorno di esperimento dei topi WT-acqua ( $10.15 \pm 3.04$  sec;  $n = 5$ ) sia statisticamente minore sia dei trisomici non trattati (Ts65Dn-acqua,  $35.07 \pm 5,88$  s;  $n = 8$ ) che dei down trattati (Ts65Dn-flx,  $44 \pm 5.86$  s;  $n = 8$ ). Questi dati confermano la presenza di deficit nell'apprendimento spaziale del ceppo Ts65Dn, ma non mostrano differenze significative tra i topi trattati e non. Le prestazioni degli animali Wt-flx ( $23.55 \pm 9.33$  s;  $n = 4$ ) non differiscono significativamente da quelle di Wt-acqua (fig 3.2)

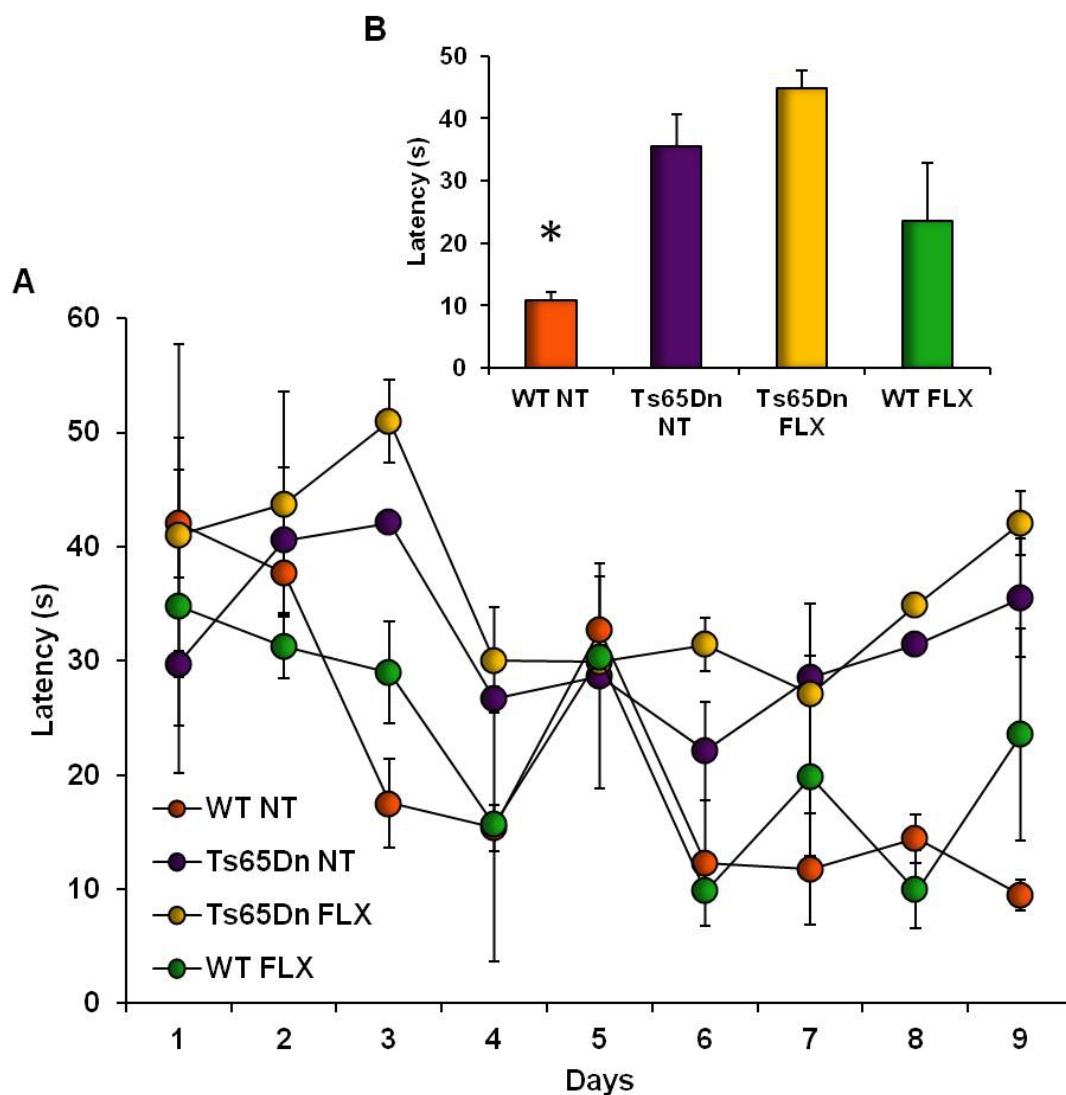


Fig 3.2 (a) Curve di apprendimento per Wt-acqua (arancio), Ts65Dn-acqua (viola), Ts65Dn-flx (giallo) e Wt-flx (verde). (b) L'istogramma mostra la latenza nell'individuare la piattaforma sommersa nel corso dell'ultimo giorno di esperimento in tutti e quattro i gruppi. Al nono giorno di esperimento è possibile osservare una differenza tra Wt-acqua e i Ts65Dn-acqua

e tra i Wt-acqua e i Ts65Dn-flx (comparazione multipla di Holm-Sidak,  $p < 0,05$ ), ma non tra gli altri gruppi

In linea con quanto descritto in letteratura, gli animali Ts65Dn mostrano una ridotta memoria spaziale nel test senza piattaforma (*probe*). Mentre gli animali Wt-acqua trascorrono la maggior parte del tempo nuotando nel quadrante ove si trovava la piattaforma, i topi Ts65Dn-acqua nuotano indiscriminatamente in tutti i quadranti non mostrando preferenze, mettendo così in evidenza l'incapacità di ricordare la posizione della piattaforma. Viceversa, i Ts65Dn trattati con fluoxetina trascorrono la maggior parte del tempo nel quadrante di interesse (fig 3.3). Anche se questa tendenza non è statisticamente differente da quella dei Ts65Dn-acqua, suggerisce un trend positivo verso il recupero delle funzioni cognitive.

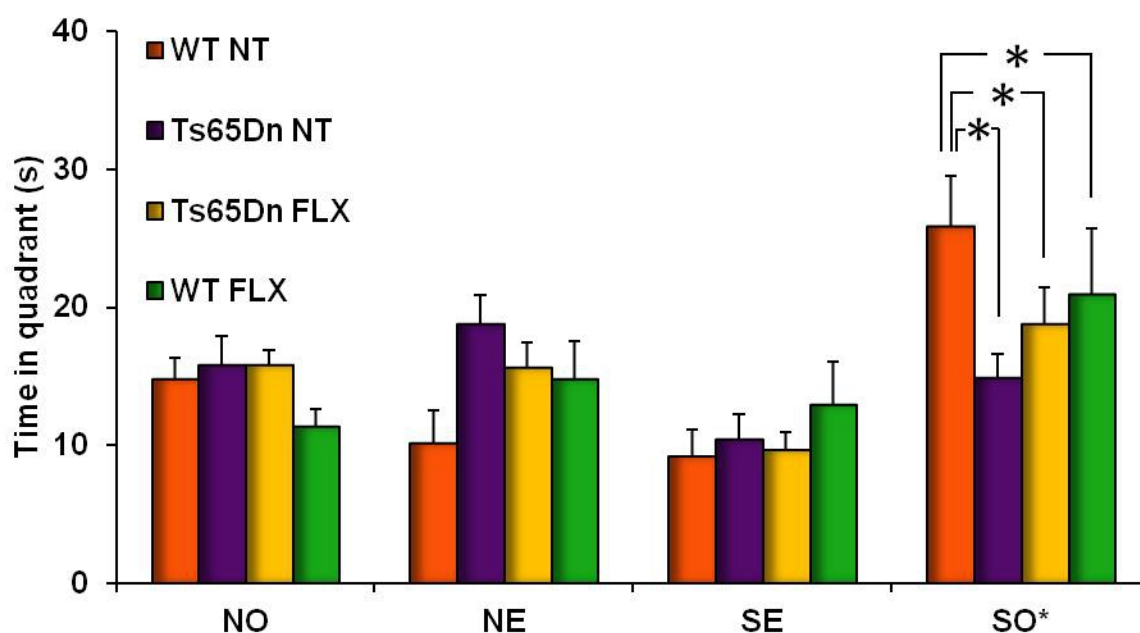


Fig. 3.3. Si evidenzia una significativa differenza sperimentale tra i quattro gruppi nella scelta del quadrante (ANOVA a due vie,  $P < 0,001$ ). I topi Ts65Dn-acqua non mostrano preferenza per il quadrante di interesse, mentre quelli Wt trascorrono la maggior parte del tempo nel quadrante SO (comparazione multipla di Holm-Sidak). Inoltre il tempo che i topi Wt-acqua trascorrono in SO è significativamente maggiore rispetto agli altri 3 gruppi ( $p < 0,05$ )

### 3.3 - Studio della memoria spaziale mediante il Novel Place Recognition (NPR).

Le prestazioni cognitive di memoria spaziale a breve termine dei topi Ts65Dn e dei controlli WT sono state valutate mediante l'utilizzo del Novel Place Recognition Test (NPR), un test in cui è stato riportato che i topi Ts65Dn presentano deficit molto gravi (Kleschevnikov et al., 2012). Tale test valuta la capacità degli animali di discriminare una posizione nuova rispetto ad una vecchia di un oggetto a loro familiare e il corretto svolgimento di questo tipo di compito è stato correlato con una appropriata funzionalità delle strutture ippocampali (Mumby et al., 2002).

Nella fase di acquisizione, tutti i gruppi sperimentali hanno esplorato entrambi gli oggetti in maniera equivalente, non mostrando alcun tipo di preferenza. Pertanto, tutti gli indici di discriminazione calcolati sono risultati vicini al 50% (WT-acqua,  $54.87 \pm 3.5\%$ ; Ts65Dn-acqua,  $47.82 \pm 4.45\%$ ; Ts65Dn-flx,  $53.49 \pm 1.62\%$ ; WT-flx,  $55.22 \pm 3.26\%$ ) (Fig. 3.4).

Nella fase di test, invece, mentre i topi Wt-acqua hanno evidenziato una preferenza di esplorazione per l'oggetto spostato (indice di discriminazione:  $76.50 \pm 3.48\%$ ), gli animali Ts65Dn-acqua hanno evidenziato la presenza di un deficit mnemonico, con tempi di esplorazione dell'oggetto spostato addirittura leggermente inferiori rispetto e quelli dell'oggetto non spostato (indice di discriminazione:  $37.20 \pm 7.58\%$ ) (Fig. 3.4).

Il trattamento con fluoxetina ha promosso un completo recupero delle capacità mnemoniche nei topi trisomici, che hanno infatti mostrato una chiara preferenza di esplorazione nei confronti dell'oggetto spostato (indice di discriminazione:  $64.04 \pm 5.65\%$ ) (Fig. 3.4). Negli animali euploidi, la fluoxetina non ha modificato i tempi di esplorazione dei due oggetti ( $64.52 \pm 7.41\%$ ).

### Place recognition task

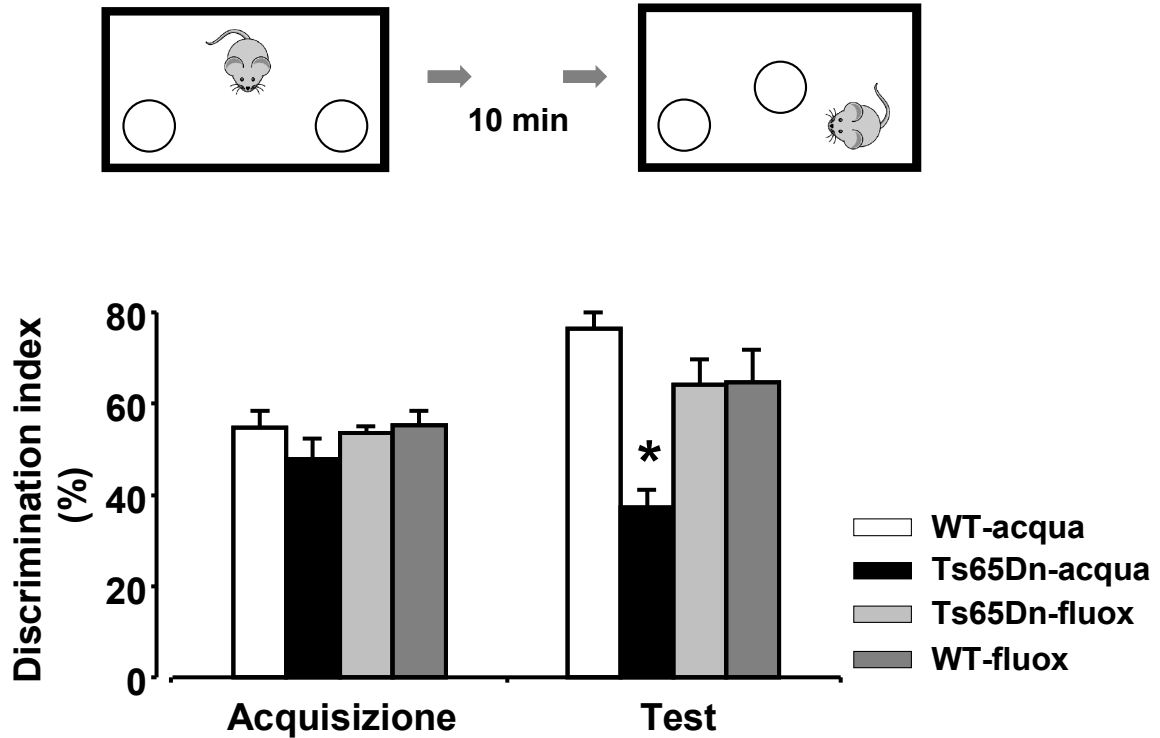


Fig. 3.4. Apprendimento spaziale nel Novel Place Recognition (NPR). Nella fase di acquisizione non sono state riscontrate differenze negli indici di esplorazione dei vari gruppi di animali (ANOVA a una via, metodo di comparazione multipla di Holm-Sidak,  $p=0.377$ ). Nella fase di test, è stato invece riscontrato un indice di esplorazione significativamente più basso negli animali Ts65Dn-acqua rispetto ai Wt-acqua (ANOVA a una via, metodo di comparazione multipla di Holm-Sidak,  $p=0.01$ ). Al contrario, i topi Ts65Dn-flx hanno evidenziato un indice statisticamente più alto dei Ts65Dn-acqua, non significativamente diverso dal gruppo dei Wt-acqua (ANOVA a una via, metodo di comparazione multipla di Holm-Sidak,  $p=0.01$  e  $p=0.112$ , rispettivamente). Il trattamento con fluoxetina non ha influenzato in maniera significativa la performance degli animali euploidi ( $p=0.188$ ).

### 3.4 – Studio della plasticità sinaptica a lungo termine nell'ippocampo

Poiché i deficit di memoria spaziale mostrati dagli animali Ts65Dn sono stati in più casi associati a una ridotta plasticità sinaptica ippocampale, ho condotto uno studio di misurazione dei livelli di LTP nel campo CA1 dell'ippocampo in risposta ad una stimolazione tetanica (TBS) applicata a livello delle collaterali di Schaffer. Studi precedenti hanno riportato deficit marcati in tale forma di plasticità a lungo termine nei topi Ts65Dn (Siarey et al., 1997; Kleschevnikov et al., 2004; Costa and Grybko, 2005).

I miei risultati (Fig. 3.3 a) mostrano che, dopo un episodio di TBS, il potenziamento della risposta rispetto alla baseline è risultato significativo sia negli animali Wt-acqua ( $167.91 \pm 8.64\%$ ) sia nei topi Ts65Dn-acqua ( $134.68 \pm 11.14\%$ ). In questo secondo gruppo di animali, però, il livello di potenziamento è risultato significativamente più basso rispetto a quello dei Wt-acqua, rivelando una parziale occlusione della plasticità nei topi trisomici.

Il trattamento con fluoxetina ha portato a una completa compensazione di tale deficit. Infatti, gli animali Ts65Dn-flx hanno mostrato livelli di potenziamento delle risposte sinaptiche ( $167.31 \pm 10.71\%$ ) significativamente maggiori rispetto al gruppo Ts65Dn-acqua, ma non statisticamente diversi da quelli dei Wt-acqua. Non è stata invece riscontrata alcuna differenza tra i gruppi Wt-flx e Wt-acqua ( $183.87 \pm 12.40\%$ ).

Il trattamento cronico con fluoxetina non ha invece indotto cambiamenti significativi nelle curve Input/Output dei Wt o dei soggetti trisomici, suggerendo che la somministrazione di tale farmaco non influenzi l'eccitabilità delle sinapsi tra le collaterali di Schaffer e i neuroni del campo CA1 (Fig. 3.5 b).

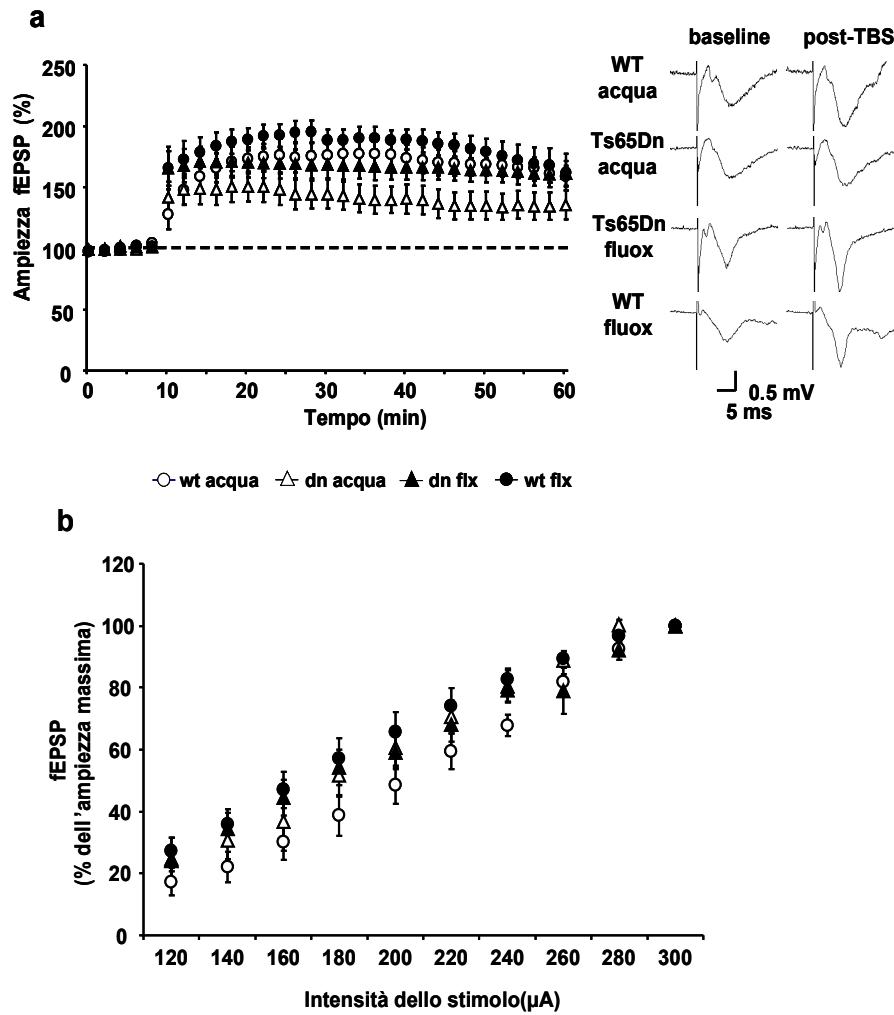


Fig. 3.5. (a) Livelli di LTP nei *Wt-acqua*, *Wt-flx*, *Ts65Dn-acqua* e *Ts65Dn-flx*. Mentre le fettine di tutti i gruppi mostrano un potenziamento della risposta a seguito della TBS (ANOVA a due vie, baseline vs. ultimi 20 minuti post-TBS, post-hoc Tukey test,  $p < 0.05$ ) I livelli di LTP risultano significativamente più bassi nei topi *Ts65Dn-acqua* rispetto ai *Wt-acqua* (ANOVA a due vie, baseline vs. ultimi 20 minuti post-TBS, post-hoc Tukey test,  $p < 0.05$ ). I livelli di LTP dei topi *Ts65Dn-flx* sono significativamente più alti dei *Ts65Dn-acqua*, ma non differiscono dai *Wt-acqua* (ANOVA a due vie, post-hoc Tukey test,  $p < 0.05$  e  $p = 1.0$  rispettivamente). Non sono state riscontrate differenze significative tra i livelli di LTP dei *Wt-acqua* e quelli dei *Wt-flx*. Sono inoltre riportati esempi di risposte pre e post-theta per i quattro gruppi sperimentali. (b) Il grafico riporta l'ampiezza dei potenziali di campo eccitatori post sinaptici (fEPSP) normalizzata sul livello di saturazione ed espressa in funzione dell'intensità di stimolazione, nei quattro gruppi sperimentali. L'ANOVA a due vie non mostra cambiamenti significativi tra i diversi genotipi e trattamenti ( $p=0.339$ ).



## 4- DISCUSSIONE

I dati riportati nella presente Tesi dimostrano che la fluoxetina può essere utilizzata senza rischi e con successo per favorire il recupero da deficit cognitivi e di plasticità sinaptica nel modello murino più studiato di SD, la linea Ts65Dn.

Ho iniziato la valutazione del trattamento cronico con fluoxetina sul ceppo Ts65Dn utilizzando il test di Morris (MWM). I miei risultati confermano la presenza di importanti deficit nell'apprendimento spaziale e nella memoria nei topi trisomici non trattati. In linea con quanto riscontrabile in letteratura, questi deficit sono associabili con una diminuita capacità di potenziamento a lungo termine (LTP) nelle sinapsi tra le collaterali di Schaffer e le piramidali del campo CA1 dell'ippocampo. A seguito delle 8 settimane di trattamento farmacologico non ho riscontrato miglioramenti da parte dei Ts65Dn nelle performance del MWM, ma è stato evidenziato un pieno recupero della loro capacità di manifestare LTP; questo indica che la fluoxetina ha portato cambiamenti funzionali tali da favorire la plasticità sinaptica nelle circuiterie ippocampiche. Anche se, nella maggior parte dei casi, una ridotta capacità di LTP in ippocampo è associata ad uno scarso apprendimento spaziale (Wilson e Tonegawa, 1997), esistono evidenze sul fatto che le prestazioni nel MWM possono essere scarse anche se il potenziamento a lungo termine è preservato; è stato anche riportato il fenomeno opposto, dimostrando che buoni risultati nel MWM sono possibili anche in animali dove il processo di LTP è ridotto (Cain et al., 1997). È importante sottolineare come il MWM richieda abilità complesse per i roditori che devono attuare una moltitudine di sofisticati processi mnemonici. Queste abilità prevedono l'acquisizione della localizzazione spaziale degli stimoli visivi, che devono poi essere processati, consolidati, mantenuti, e recuperati al fine di poter raggiungere la piattaforma sommersa (Morris, 1984; McNamara e Skelton, 1993; Terry, 2009). L'ippocampo è sicuramente una struttura essenziale per l'apprendimento nel MWM, ma altre strutture cerebrali quali: il proencefalo basale, lo striato, il cervelletto e la corteccia cerebrale, sono altrettanto coinvolte in questo test (d'Hooge e Deyn, 2001). Inoltre, l'apprendimento spaziale in generale e, in maniera particolare il MWM, sembrano dipendere dall'azione coordinata di tutte queste strutture; ciò comporta che la disfunzione di una qualsiasi di esse possa diminuire la capacità di completare con successo questo test. È importante sottolineare come sia negli affetti da SD che nei topi TS65Dn tutte queste strutture sono compromesse dalla trisomia. Un alterato sviluppo neurale è riscontrabile nelle conformazioni aberranti di ippocampo (Lorenzi e Reeves, 2006; Bianchi et al., 2010) e cervelletto (Roper et al., 2006), da questo probabilmente dipendono le ridotte capacità di affrontare il MWM dei giovani topi

Ts65Dn. Dalla precoce degenerazione neuronale del proencefalo basale, tipica di questo ceppo, dipende invece l'accelerato declino correlato all'età che si riscontra nelle abilità richieste. Inoltre, dati raccolti su pazienti affetti da SD indicano un'alterata capacità prefrontale di processare le informazioni. E' possibile supporre che una simile disfunzione prefrontale provocata dalla trisomia possa contribuire a peggiorare le capacità dei topi Ts65Dn nell'affrontare il MWM, analogamente a quanto osservato nei ratti con lesioni prefrontali (Mogensen et al., 1995). Così sembra che i benefici effetti del trattamento con fluoxetina sulle funzionalità ippocampali, dimostrati nel mio studio dal ripristino di una normale capacità di LTP in ippocampo, non siano sufficienti a compensare i numerosi deficit funzionali e strutturali che minano le capacità dei topi Ts65Dn di completare con successo il MWM.

Questi risultati suggeriscono altresì la possibilità di migliorare, in età adulta, il fenotipo neurologico associato a precoci anomalie dello sviluppo del sistema nervoso, concetto che raccoglie un largo interesse per le sue potenziali applicazioni cliniche (Silva e Ehninger, 2009). Un recente studio ha riportato che un trattamento con alte dosi di fluoxetina non favorisce un recupero comportamentale nel modello Ts65Dn, ma risulta addirittura associato a gravi effetti collaterali, come la comparsa di crisi convulsive e perfino la morte (Heinen et al., 2012). La dose di fluoxetina utilizzata in questo precedente lavoro corrisponde a circa 80 mg/Kg/die, una dose due volte superiore a quella che, nella presente Tesi, è risultata essere associata ad un significativo numero di morti e di crisi epilettiche. Mentre questo schema ad alto dosaggio sembra efficace nel promuovere la plasticità nella corteccia visiva del ratto adulto (Maya Vetencourt et al., 2008), i risultati raccolti in questa Tesi suggeriscono che dosi minori di fluoxetina (circa 10 mg/Kg/die) debbano essere impiegate per ottenere un miglior bilancio rischi/benefici nel modello Ts65Dn, maggiormente suscettibile a crisi di tipo epilettico (Westmark et al., 2010).

In accordo con i dati raccolti nella presente ricerca, Castrén e collaboratori riportano che un analogo basso dosaggio di fluoxetina è sufficiente ad incrementare la plasticità cerebrale nei circuiti neurali del topo coinvolti nella memoria della paura (Karpova et al., 2011). Inoltre, è stato anche mostrato come questo protocollo di trattamento cronico con fluoxetina porti a livelli plasmatici del farmaco simili a quelli raggiunti da pazienti umani trattati con lo stesso (Raju et al., 1999; Karpova et al., 2011). Questi risultati, nel loro complesso, incoraggiano ulteriori studi volti ad investigare l'applicabilità della fluoxetina sulle persone affette da SD.

Attualmente, all'Istituto di Neuroscienze del CNR di Pisa, il gruppo di ricerca del Dott.

Sale sta raccogliendo dati che dimostrano come il rilascio di GABA, statisticamente accresciuto nell'ippocampo dei topi Ts65dn rispetto agli animali euploidi, venga riportato a livelli normali dopo 8 settimane di trattamento cronico con fluoxetina. Questi risultati confermano il fatto che l'eccessiva inibizione sia il meccanismo cellulare alla base della patogenesi della SD (Fernandez and Garner, 2007) e suggeriscono che gli effetti benefici della fluoxetina siano dovuti ad una normalizzazione del tono inibitorio intra-cerebrale. In accordo con tale ipotesi, studi recenti hanno dimostrato che l'azione fluoxetina promuove la plasticità neurale tramite una riduzione dei livelli di GABA, sia in corteccia visiva sia nel midollo spinale (Maya-Vetencourt et al., 2008; Scali et al., 2013).

Nel topo Ts65dn la riduzione dei livelli di inibizione per mezzo di vari agenti farmacologici porta ad un recupero dei deficit cognitivi (Fernandez et al., 2007; Rueda et al., 2008; Kleschevnikov et al., 2012; Colas et al., 2013; Martinez-Cue et al., 2013). L'approccio più comune, quello di una diretta modulazione dei recettori GABA-a e GABA-b, comporta però, è di ridotta applicabilità all'uomo, perché comporta l'uso di farmaci utilizzati non approvati dalla FDA o con un'indesiderata azione pro-convulsivante. In questo contesto, la mia ricerca indica che il trattamento con fluoxetina alla dose di 10 mg/Kg/die consente di ridurre l'inibizione e di evitare effetti collaterali potenzialmente letali, promuovendo un marcato recupero della plasticità sinaptica e delle abilità cognitive nei topi Ts65Dn adulti.

La capacità della fluoxetina di ridurre il rilascio di GABA potrebbe essere legata direttamente all'innalzamento dei livelli cerebrali di serotonina (5-HT) che questo farmaco comporta. Infatti, la 5-HT inibisce il rilascio di GABA in varie regioni del cervello, agendo tramite un meccanismo presinaptico mediato dalla famiglia dei recettori della serotonina 5-HT<sub>1/2</sub> (Koyama et al., 1999; Xiang and Prince, 2003) e probabilmente regolando la disponibilità delle vescicole di neurotrasmettitore (Wang and Zucker, 1998). Questi risultati sono in accordo con quanto già dimostrato in ratti adulti sottoposti ad arricchimento ambientale o a trattamento con fluoxetina. In entrambi i modelli è stato dimostrato un incremento dei livelli di 5-HT accompagnato da una diminuzione del rilascio di GABA extracellulare (Sale et al., 2007; Maya Vetencourt et al., 2008; Baroncelli et al., 2010).

La fluoxetina potrebbe migliorare le capacità mnemoniche e la plasticità sinaptica dei topi Ts65dn anche mediante meccanismi molecolari diversi dalla regolazione dei livelli di rilascio del GABA. In particolare, la fluoxetina potrebbe stimolare un recupero funzionale attraverso la sua capacità di promuovere l'espressione del BDNF e la neurogenesi ippocampale (Castren, 2004; Clark et al., 2006; Bianchi et al., 2010) alterate nei pazienti e nei

modelli animali di SD (Bimonte-Nelson et al., 2003; Pollonini et al., 2008; Bartesaghi et al., 2011),

Negli ultimi decenni l'aspettativa di vita degli individui affetti da SD è cresciuta grazie al miglioramento dell'assistenza sanitaria, tanto da permettere loro di sopravvivere ai genitori. Pertanto, la ricerca di trattamenti capaci di migliorare le funzioni cognitive nei soggetti con SD è estremamente importante ed attuale. La presente ricerca può incoraggiare nuovi tentativi sperimentali volti ad investigare le potenzialità della fluoxetina nel trattamento dei deficit funzionali in persone adulte affette da SD.

## BIBLIOGRAFIA

- Abraham H., Tornoczky T., Kosztolanyi G. and Seress L. (2001), Cell formation in the cortical layers of the developing human cerebellum - *Int. J. Dev. Neurosci.* 19, 53-62
- 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
- Altman J. and Bayer S.A. (1990), Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods - *J. Comp. Neurol.* 301, 365-381
- Antonarakis S.E., Lyle R., Dermitzakis E.T., Raymond A., Deutsch S. (2004), Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology - *Nat Rev Genet.*, 5(10):725-38. Review
- Banik N.L., Davison A.N., Palo J. and Savolainen H. (1975), Biochemical studies on myelin isolated from the brains of patients with Down's syndrome - *Brain* 98, 213-218
- Baroncelli L., Braschi C., Spolidoro M., Begenisic T., Sale A. e Maffei L. (2010), Nurturing brain plasticity: impact of environmental enrichment. - *Cell Death and Differentiation* 17:1092-1103
- Baroncelli L, Sale A, Viegi A, Maya Vetencourt JF, De Pasquale R, Baldini S, Maffei L (2010) Experience-dependent reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Exp Neurol* 226:100-109.
- Baroncelli L, Braschi C, Spolidoro M, Begenisic T, Maffei L, Sale A (2011) Brain plasticity and disease: a matter of inhibition. *Neural Plast* 2011:286073.
- Bartesaghi R, Guidi S, Ciani E (2011) Is it possible to improve neurodevelopmental abnormalities in Down syndrome? *Rev Neurosci* 22:419-455.
- 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
- Becker L., Mito T., Takashima S. and Onodera K. (1991), Growth and development of the brain in Down syndrome - *Prog. Clin. Biol. Res.* 373, 133-152
- Belichenko P.V., Kleschevnikov A.M., Masliah E., Villar A.J., Epstein C.J. e Mobley W.C. (2002), Excitatory-inhibitory relationships in fascia dentate in Ts65Dn mice - *Soc. Neurosci. Abstr.* 715:5
- Belichenko P.V., Masliah E., Kleschevnikov A.M., Villar A.J., Epstein C.J., Salehi A. e Mobley W.C. (2004), Synaptic structural abnormalities in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome -

Journal 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 PV, Kleschevnikov AM, Masliah E, Wu C, Takimoto-Kimura R, Salehi A, Mobley WC (2009) Excitatory-inhibitory relationship in the fascia dentata in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. J Comp Neurol 512:453-466.

Begenisic T, Spolidoro M, Braschi C, Baroncelli L, Milanese M, Pietra G, Fabbri ME, Bonanno G, Cioni G, Maffei L, Sale A (2011) Environmental enrichment decreases GABAergic inhibition and improves cognitive abilities, synaptic plasticity, and visual functions in a mouse model of Down syndrome. Front Cell Neurosci 5:29.

Berardi N., Pizzorusso T. e Maffei L. (2000), Critical periods during sensory development - Current Opinion in Neurobiology 10: 38–145

Berardi N. et al. (2003), Molecular basis of plasticity in the visual cortex - Trends Neurosci. 26, 369–378

Best TK, Siarey RJ, Galdzicki Z (2007) Ts65Dn, a mouse model of Down syndrome, exhibits increased GABAB-induced potassium current. J Neurophysiol 97:892-900.

Bevins RA, Besheer J (2006) Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. Nat Protoc 1:1306-1311.

Bianchi P, Ciani E, Guidi S, Trazzi S, Felice D, Grossi G, Fernandez M, Giuliani A, Calzà L, Bartesaghi R. Early pharmacotherapy restores neurogenesis and cognitive performance in the Ts65Dn mouse model for Down syndrome. J Neurosci. 2010 Jun 30;30(26):8769-79. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0534-10.2010.

Bianchi P, Ciani E., Guidi S., Trazzi S., Felice D., Grossi G., Fernandez M., Giuliani A., Calza 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

Bimonte-Nelson HA, Hunter CL, Nelson ME, Granholm AC (2003) Frontal cortex BDNF levels correlate with working memory in an animal model of Down syndrome. Behav Brain Res 139:47-57.

Brazel C.Y., Romanko M.J., Rothstein R.P. and Levison S.W. (2003), Roles of the mammalian subventricular zone in brain development - Prog. Neurobiol. 69, 49–69

Busciglio J. and Yankner B.A. (1995), Apoptosis and increase generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro - Nature 378, 776–779

Busciglio J., Pelsman A., Wong C., Pigino G., Yuan M., Mori H. and Yankner B.A. (2002), Altered metabolism of the amyloid beta precursor protein is associated with mitochondrial

dysfunction in Down's syndrome - *Neuron* 33, 677–688.

Cain DP, Saucier D, Boon F. Testing hypotheses of spatial learning: the role of NMDA receptors and NMDA-mediated long-term potentiation. *Behav Brain Res.* 1997 Mar;84(1-2):179-93.

Cancedda L., Putignano E., Sale A., Viegi A., Berardi N., e Maffei L. (2004), Acceleration of visual system development by environmental enrichment. - *J. Neurosci* 24:4840–4848

Capone, G. (2006). Neurobehavioral disorders in children, adolescents, and young adults with Down syndrome. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 142 , 158 – 172.

Carlesimo, G.A., Marotta, L., and Vicari, S. (1997). Long-term memory in mental retardation: evidence for a specific impairment in subjects with Down ' s syndrome. *Neuropsychologia* 35, 71 – 79.

Castren E (2004) Neurotrophins as mediators of drug effects on mood, addiction, and neuroprotection. *Mol Neurobiol* 29:289-302.

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.

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.

Chang Q. e Gold P.E. (2008), Age-related changes in memory and in acetylcholine functions in the hippocampus in the Ts65Dn mouse, a model of Down syndrome. – *Neurobiol. Learn. Mem.* 89(2):167-77

Chapman, R.S. and Hesketh, L.J. (2000). Behavioral phenotype of individuals with Down syndrome. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 6 , 84 – 95.

Chollet F et al. 2011. Fluoxetine for motor recovery after acute ischaemic stroke (FLAME): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 10, 123-30.

Cirrito JR et al. 2011. Serotonin signaling is associated with lower amyloid-beta levels and plaques in transgenic mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 14968-73

Clark S., Schwalbe J., Stasko M.R., Yarowsky P.J. e Costa A.C. (2006), Fluoxetine rescues deficient neurogenesis in hippocampus of the Ts65Dn mouse model for Down syndrome. – *Exp. Neurol.* 200(1):256-61

Colas D, Chuluun B, Warriar D, Blank M, Wetmore DZ, Buckmaster P, Garner CC, Heller HC (2013) Short-term treatment with the GABAA receptor antagonist pentylentetrazole produces a sustained pro-cognitive benefit in a mouse model of Down's syndrome. *Br J Pharmacol* 169:963-973.

Contestabile, A., Fila, T., Bartesaghi, R., and Ciani, E. (2009). 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., 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.

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. USA* 98 , 10439 – 10444.

Costa A.C. e 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.* 15;382(3):317-22.

Costa, A.C., Walsh, K., and Davisson, M.T. (1999). Motor dysfunction in a mouse model for Down syndrome. *Physiol. Behav.* 68 , 211 – 220.

Costa AC, Scott-McKean JJ, Stasko MR (2008) Acute injections of the NMDA receptor antagonist memantine rescue performance deficits of the Ts65Dn mouse model of Down syndrome on a fear conditioning test. *Neuropsychopharmacology* 33:1624-1632.

Costa AC, Stasko MR, Schmidt C, Davisson MT Behavioral validation of the Ts65Dn mouse model for Down syndrome of a genetic background free of the retinal degeneration mutation *Pde6b(rd1)*. *Behav Brain Res* 206:52-62.

Courage M.L., Adams R.J., Reyno S. e Kwa P. (1994), Visual acuity in infants and children with Down syndrome. - *Developmental Medicine & Child Neurology* 36( 7):586–593

Coyle, J.T., Oster-Granite, M.L., and Gearhart, J.D. (1986). The neurobiologic consequences of Down syndrome. *Brain Res. Bull.* 16 , 773 – 787.

Crapper-McLachlan, D.R. (1986). Clinical expression of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Psychiatr. Clin. North Am.* 9, 659 – 670.

D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev.* 2001 Aug;36(1):60-90. Review.

Davisson, M.T., Schmidt, C., Reeves, R.H., Irving, N.G., Akeson, E.C., Harris, B.S., and Bronson, R.T. (1993). Segmental trisomy as a mouse model for Down syndrome. *Prog. Clin. Biol. Res.* 384 , 117 – 133.

De la Monte, S.M., Sohn, Y.K., Ganju, N., and Wands, J.R. (1998). P53- and CD95-associated apoptosis in neurodegenerative diseases. *Lab. Invest.* 78 , 401 – 411.

Delcroix, J.D., Valletta, J., Wu, C., Howe, C.L., Lai, C.F., Cooper, J.D., Belichenko, P.V., Salehi, A., and Mobley, W.C. (2004). Trafficking the NGF signal: implications for normal and degenerating neurons. *Prog. Brain Res.* 146 , 3 – 23.



Delebar J.M., Theophile D., Rahmani Z., Chettouh Z., Blouin J.L., Prieur M., Noel B. e Sinet P.M. (1993), Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. - *Eur. J. Hum. Genet.* 1(2):114-24

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.

Di Cristo G., Chattopadhyaya B., Kuhlman S. J., Fu Y., Bélanger M. C., Wu C. Z., Rutishauser U., Maffei L. e Huang Z. J. (2007), Activitydependent PSA expression regulates inhibitory maturation and onset of critical period plasticity. - *Nature of Neuroscience.* 10:1569–1577

Dierssen M., Benavides-Piccione R., Martínez-Cué2 C., Estivill X., Flórez J., Elston G.N e DeFelipe J. (2003), Alterations of Neocortical Pyramidal Cell Phenotype in the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome: Effects of Environmental Enrichment. - *Cerebral Cortex* 13:758–764; 1047–3211

Dierssen, M., Vallina, I.F., Baamonde, C., Garcia-Calatayud, S., Lumbreras, M.A., and Florez, J. (1997). Alterations of central noradrenergic transmission in Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome. *Brain Res.* 749 , 238 – 244.

Dierssen M (2012) Down syndrome: the brain in trisomic mode. *Nat Rev Neurosci* 13:844-858.

Dykens, E., Hodapp, R., and Evans, D. (1994). Profiles and development of adaptive behavior in children with Down syndrome. *Am. J. Ment. Retard.* 98, 580 – 587.

Escorihuela, R.M., Vallina, I.F., Martinez-Cue, C., Baamonde, C., Dierssen, M., Tobena, A., Florez, J., and Fernandez-Teruel, A. (1998). Impaired short- and long-term memory in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Neurosci. Lett.* 247 , 171 – 174.

Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Vallina IF, Baamonde C, Lumbreras MA, Dierssen M, Tobena A, Florez J (1995) A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. *Neurosci Lett* 199:143-146.

Fagiolini M. e Hensch T. K. (2000). Inhibitory threshold for criticalperiod activation in primary visual cortex. - *Nature* 404:183–186

Feldman, D. E. (2000), Inhibition and plasticity. - *Nat. Neurosci.* 3:303–304

Fernandez F., Morishita W., Zuniga E., Nguyen J., Blank M., Malenka R.C. e Garner C.C. (2007), Pharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of Down syndrome. - *Nature of Neuroscience* 10(4):411-413

Fernandez, F. e Garner C. C. (2007), Over-inhibition: a model for developmental intellectual disability. - *Trends Neurosci.* 30:497–503

Fernandez F, Morishita W, Zuniga E, Nguyen J, Blank M, Malenka RC, Garner CC (2007) Pharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of Down syndrome. *Nat Neurosci* 10:411-413.

Ferrer, I. and Gullotta, F. (1990). Down ' s syndrome and Alzheimer ' s disease: dendritic spine counts in the hippocampus. *Acta Neuropathol.* 79 , 680 – 685.

Fukuda Y., Berry T.L., Nelson M., Hunter C.L., Fukuhara K., Imai H., Ito S., Granholm-Bentley A.C., Kaplan A.P. e Mutoh T. (2010) Stimulated neuronal expression of brain-derived neurotrophic factor by Neurotrophin. – *Mol. Cell. Neurosci.* 45(3):226-33

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 coclea nucleus. *J. Neurol. Sci.* 51 , 43 – 50.

Gardiner K, Fortna A, Bechtel L, Davisson MT (2003) Mouse models of Down syndrome: how useful can they be? Comparison of the gene content of human chromosome 21 with orthologous mouse genomic regions. *Gene* 318:137-147.

Ghosh S, Feingold E & Dey SK (2009) Etiology of Down syndrome: evidence for consistent association among altered meiotic recombination, nondisjunction, and maternal age across populations. *American Journal of Medical Genetics. Part A* 149A 1415–1420.

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.

Granholm A.C., Ford K.A., Hyde L.A., Bimonte H.A., Hunter C.L., Nelson M., Albeck D., Sanders L.A., Mufson E.J. e Crnic L.S. (2002), Estrogen restores cognition and cholinergic phenotype in an animal model of Down syndrome. – *Physiol. Behav.* 77(2-3):371-85

Granholm A.E., Sanders L., Seo H., Lin L., Ford K. e Isacson O. (2003), Estrogen alters amyloid precursor protein as well as dendritic and cholinergic markers in a mouse model of Down syndrome. – *Hippocampus* 13, 8: 905–914

Griffin, W.S., Sheng, J.G., McKenzie, J.E., Royston, M.C., Gentleman, S.M., Brumback, R.A., Cork, L.C., Del Bigio, M.R., Roberts, G.W., and Mrak, R.E. (1998). Life-long overexpression of S100beta in Down's syndrome: implications for Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol. Aging* 19 , 401 – 405.

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.

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. (2011a). Widespread proliferation impairment and hypocellularity in the cerebellum of fetuses with Down syndrome. *Brain Pathol.* 21 , 361 – 373.

Guidi, S., Stagni, F., Ragazzi, E., Bianchi, P., Ciani, E., and Bartesaghi, R. (2011b). Pharmacotherapy with fl uoxetine rescues dendritic hypotrophy in the Ts65Dn mouse model

for DS. 8th World Congress of IBRO, Florence, Italy, July 14 – 18, 2011.

Guidi S, Stagni F, Bianchi P, Ciani E, Ragazzi E, Trazzi S, Grossi G, Mangano C, Calza L, Bartesaghi R (2012) Early pharmacotherapy with fluoxetine rescues dendritic pathology in the Ts65Dn mouse model of down syndrome. *Brain Pathol* 23:129-143.

Gulesserian, T., Engidawork, E., Fountoulakis, M., and Lubec, G. (2001). Antioxidant proteins in fetal brain: superoxide dismutase-1 (SOD-1) protein is not overexpressed in fetal Down syndrome. *J. Neural. Transm. Suppl.* 61, 71 – 84.

Haemisch A., Voss T., Gärtner K. (1994), Effects of environmental enrichment on aggressive behavior, dominance hierarchies, and endocrine states in male DBA/2J mice. – *Physiol. Behav.* 56:1041–8

Hajszan T, MacLusky NJ, Leranth C (2005) Short-term treatment with the antidepressant fluoxetine triggers pyramidal dendritic spine synapse formation in rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 21:1299-1303.

Harauzov A., Spolidoro M., DiCristo G., De Pasquale R., Cancedda L., Pizzorusso T., Viegi A., Berardi N. e Maffei L. (2010), Reducing intracortical inhibition in the adult visual cortex promotes ocular dominance plasticity. - *Journal of Neuroscience* 30:361–371

Haydar, T.F., Blue, M.E., Molliver, M.E., Krueger, B.K., and Yarowsky, P.J. (1996). Consequences of trisomy 16 for mouse brain development: corticogenesis in a model of Down syndrome. *J. Neurosci.* 16 , 6175 – 6182.

Heinen M, Hettich MM, Ryan DP, Schnell S, Paesler K, Ehninger D (2012) Adult-onset fluoxetine treatment does not improve behavioral impairments and may have adverse effects on the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neural Plast* 2012:467251.

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.

Heller J.H., Spiridigliozzi G.A., Doraiswamy P.M., Sullivan J.A., Crissman B.G. e Kishnani P.S. (2004), Donepezil effects on language in children with Down syndrome: results of the first 22-week pilot clinical trial. – *Am. J. Med. Genet. A.* 15;130A(3):325-326

Hensch T. K. (2004), Critical period regulation. - *Annu. Rev. Neurosci.* 27:549–79

Hensch, T. K., Fagiolini, M., Mataga, N., Stryker, M. P., Baekkeskov, S. e Kash, S. F. (1998), Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. - *Science* 282:1504–1508

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. USA* 93 , 13333 – 13338.

Hook EB, Cross PK, Schreinemachers DM (1983) Chromosomal abnormality rates at

amniocentesis and in live-born infants. *JAMA* 249: 2034-2038.

Huang, Z. J., Kirkwood, A., Pizzorusso, T., Porciatti, V., Morales, B., Bear, M. F., Maffei, L. e Tonegawa, S. (1999), BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. - *Cell* 98:739–755

Hubel D.H. e Wiesel T.N. (1963), Shape and arrangement of columns in cat's striate cortex. - *J. Physiol.* 165:559-68  
*Hum. Mol. Genet.* 9 , 195 – 202.

Hunt PA & Hassold TJ (2008) Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends in Genetics* 24 86–93.

Hunter C.L., Isacson O., Nelson M., Bimonte-Nelson H., Seo H., Lin L., Ford K., Kindy M.S. e Granholm A. (2003), Regional alterations in amyloid precursor protein and nerve growth factor across age in a mouse model of Down's syndrome. – *Neuroscience Research* 45:437-445

Insausti, A.M., Megias, M., Crespo, D., Cruz-Orive, L.M., Dierssen, M., Vallina, I.F., Insausti, R., and Florez, J. (1998). Hippocampal volume and neuronal number in Ts65Dn mice: a murine model of Down syndrome. *Neurosci. Lett.* 253 , 175 – 178.

Jones KT (2008) Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. *Human Reproduction Update* 14:143–158.

Kaduszkiewicz H., Zimmermann T, Beck-Bornholdt H.P. e van den Bussche H. (2005), Cholinesterase inhibitors for patients with Alzheimer's disease: systematic review of randomised clinical trials. – *B.M.J.* 331(7512):321-7. Review

Kahlem, P, Sultan, M., Herwig, R., Steinfath, M., Balzereit, D., Eppens, B., Saran, N.G., Pletcher, M.T., South, S.T., Stetten, G., et al. (2004). Transcript level alterations reflect gene dosage effects across multiple tissues in a mouse model of down syndrome. *Genome Res.* 14 , 1258 – 1267.

Karpova NN, Pickenhagen A, Lindholm J, Tiraboschi E, Kuleskaya N, Agustsdottir A, Antila H, Popova D, Akamine Y, Bahi A, Sullivan R, Hen R, Drew LJ, Castren E (2011) Fear erasure in mice requires synergy between antidepressant drugs and extinction training. *Science* 334:1731-1734.

Keyvani, K. et al. (2004) Gene expression profiling in the intact and injured brain following environmental enrichment. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 598–609

Kishnani P.S., Sullivan J.A., Spiridigliozzi G.A., Heller J.H. e Crissman B.G. (2004), Donepezil use in Down syndrome. – *Arch. Neurol.* 61(4):605-606

Klein S.L., Kriegsfeld L.J., Hairston J.E., Rau V., Nelson R.J. e Yarowsky P.J. (1996), Characterization of sensorimotor performance, reproductive and aggressive behaviors in segmental trisomic 16 (Ts65Dn) mice. – *Physiol. Behav.* 60(4):1159-1164

Kleschevnikov A.M., Belichenko P.V., Villar A.J., Epstein C.J., Malenka R.C. e Mobley W.C. (2004),

Hippocampal long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome. – *Journal of Neuroscience* 15;24(37):8153-8160

Kleschevnikov AM, Belichenko PV, Gall J, George L, Nosheny R, Maloney MT, Salehi A, Mobley WC (2012) Increased efficiency of the GABAA and GABAB receptor-mediated neurotransmission in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neurobiol Dis* 45:683-691.

Koo, B.K., Blaser, S., Harwood-Nash, D., Becker, L.E., and Murphy, E.G. (1992). Magnetic resonance imaging evaluation of delayed myelination in Down syndrome: a case report and review of the literature. *J. Child Neurol.* 7, 417 – 421.

Koremberg JR, Chen XN, Shipper R, Sun Z, Gonsky R, et al. (1994) DS phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4997-5001.

Koyama S, Kubo C, Rhee JS, Akaike N (1999) Presynaptic serotonergic inhibition of GABAergic synaptic transmission in mechanically dissociated rat basolateral amygdala neurons. *J Physiol* 518 ( Pt 2):525-538.

Kurt M.A., Davies D.C., Kidd M., Dierssen M. e Flórez J. (2000), Synaptic deficit in the temporal cortex of partial trisomy 16 (Ts65Dn) mice. - *Brain Res.* 858:191–197

Lejeune J, Gautier e M, Turpin, R (1959;) Etude des chromosomes somatique de neuf enfants mongoliens. *C.R. Acad Sci* 248: 1721-1722.

Li IH, Huang WS, Shiue CY, Huang YY, Liu RS, Chyueh SC, Hu SH, Liao MH, Shen LH, Liu JC, Ma KH (2009) Study on the neuroprotective effect of fluoxetine against MDMA-induced neurotoxicity on the serotonin transporter in rat brain using micro-PET. *Neuroimage* 49:1259-1270.

Lorenzi, H.A. and Reeves, R.H. (2006). Hippocampal hypocellularity in the Ts65Dn mouse originates early in development. *Brain Res.* 1104, 153 – 159.

Lydic, J. (1979). Assessment of the quality of sitting and gait patterns in children with Down's syndrome. *Phys. Ther.* 12, 1489 – 1494.

Lyle R, Bena F, Gagos S, Gehrig C, Lopez G et al. (2008) Genotypephenotype correlations in DS identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. *Eur J of Hum Gen*, pp1-13.

Mailhes JB (2008) Faulty spindle checkpoint and cohesion protein activities predispose oocytes to premature chromosome separation and aneuploidy. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49 642–658.

Malberg JE et al. 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci.* 20, 9104-10.

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

Martin RH (2008) Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. *Reproductive Biomedicine Online* 16 523–531.

Martínez-Cué C., Baamonde C., Lumbreras M., Paz J., Davisson M.T., Schmidt C., Dierssen M. e 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.* 21;134(1-2):185-200

Martínez-Cué C., Rueda N., García E., Davisson M.T., Schmidt C. e Flórez J. (2005), Behavioral, cognitive and biochemical responses to different environmental conditions in male Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. – *Behav. Brain. Res.* 8;163(2):174-185

Martinez-Cue C, Martinez P, Rueda N, Vidal R, Garcia S, Vidal V, Corrales A, Montero JA, Pazos A, Florez J, Gasser R, Thomas AW, Honer M, Knoflach F, Trejo JL, Wettstein JG, Hernandez MC (2013) Reducing GABAA alpha5 receptor-mediated inhibition rescues functional and neuromorphological deficits in a mouse model of down syndrome. *J Neurosci* 33:3953-3966.

Maya Vetencourt J.F., Sale A., Viegi A., Baroncelli L., De Pasquale R., O'Leary O.F., Castrén E., Maffei L.. (2008), The antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex. - *Science*, 320(5874):385-8

McNamara RK, Skelton RW. Effects of intracranial infusions of chlordiazepoxide on spatial learning in the Morris water maze. II. Neuropharmacological specificity. *Behav Brain Res.* 1993 Dec 31;59(1-2):193-204.

Mito, T. and Becker, L.E. (1993). Developmental changes of S-100 protein and glial fi brillary acidic protein in the brain in Down syndrome. *Exp. Neurol.* 120 , 170 – 176.

Mogensen J, Pedersen TK, Holm S, Bang LE. Prefrontal cortical mediation of rats' place learning in a modified water maze. *Brain Res Bull.* 1995;38(5):425-34.

Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 1984 May;11(1):47-60.

Moore CS, Roper RJ (2007) The power of comparative and developmental studies for mouse models of Down syndrome. *Mamm Genome* 18:431-443.

Mumby DG, Gaskin S, Glenn MJ, Schramek TE, Lehmann H (2002) Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. *Learn Mem* 9:49-57.

Nadel, L. (2003). Down's syndrome: a genetic disorder in biobehavioral perspective. *Genes Brain Behav.* 2 , 156 – 166.

Nagy, Z.S. and Esiri, M.M. (1997). Apoptosis-related protein expression in the hippocampus in Alzheimer ' s disease. *Neurobiol. Aging* 18 , 565 – 571.

Netzer W.J., Powell C., Nong Y, Blundell J., Wong L., Duff K., Flajolet M. e Greengard P. (2010), Lowering beta-amyloid levels rescues learning and memory in a Down syndrome mouse model. - *PLoS One*. 3;5(6):e10943

Oke A, Adhiyaman V, Aziz K, Ross A (2001) Dose-dependent seizure activity associated with fluoxetine therapy. *Qjm* 94:113-114.

Oliver TR, Feingold E, Yu K, Cheung V, Tinker S, Yadav-Shah M, Masse N & Sherman SL (2008) New insights into human nondisjunction of chromosome 21 in oocytes. *PLoS Genetics* 4 e1000033.

Pelsman, A., Hoyo-Vadillo, C., Gudasheva, T.A., Seredenin, S.B., Ostrovskaya, R.U., and Busciglio, J. (2003). GVS-111 prevents oxidative damage and apoptosis in normal and Down ' s syndrome human cortical neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* 21 , 117– 124.

Pennington BF, Moon J, Edgin J, Stedron J, Nadel L (2003) The neuropsychology of Down syndrome: evidence for hippocampal dysfunction. *Child Dev* 74:75-93.

Penrose LS (1933) The relative effect of paternal and maternal age in mongolism. *Journal of Genetics* 27 219–224.

Penrose LS (1934) The relative aetiological importance of birth order and maternal age in mongolism. *Proceedings of the Royal Society (Biology)* 115 431–450.

Perez-Cremades D, Hernandez S, Blasco-Ibanez JM, Crespo C, Nacher J, Varea E (2010) Alteration of inhibitory circuits in the somatosensory cortex of Ts65Dn mice, a model for Down's syndrome. *J Neural Transm* 117:445-455.

Pham, T.M. et al. (2002) Environmental influences on brain neurotrophins in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 167–175

Pinter, J.D., Eliez, S., Schmitt, J.E., Capone, G.T., and Reiss, A.L. (2001). Neuroanatomy of Down's syndrome: a high-resolution MRI study. *Am. J. Psychiatry* 158 , 1659 – 1665.

Pollonini G, Gao V, Rabe A, Palmieriello S, Albertini G, Alberini CM (2008) Abnormal expression of synaptic proteins and neurotrophin-3 in the Down syndrome mouse model Ts65Dn. *Neuroscience* 156:99-106.

Prinz, M., Prinz, B., and Schulz, E. (1997). The growth of nonpyramidal neurons in the primary motor cortex of man: a Golgi study. *Histol. Histopathol.* 12 , 895 – 900.

Pueschel SM, Rynders JE. (1982). *DS: Advances in Biomedicine and the Behavioral Sciences*. Cambridge: Ware Press. 133 p.

Purpura, D.P. (1979). Pathobiology of cortical neurons in metabolic and unclassified dementias. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 57 , 43 – 68.

Rachidi, M. and Lopes, C. (2008). Mental retardation and associated neurological dysfunctions in Down syndrome: a consequence of dysregulation in critical chromosome 21 genes and associated molecular pathways. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 12 , 168 – 182.

Raju SS, Noor AR, Gurthu S, Giriappanavar CR, Acharya SB, Low HC, Quah SH (1999) Effect of fluoxetine on maximal electroshock seizures in mice: acute vs chronic administration. *Pharmacol Res* 39:451-454.

Rampon, C. et al. (2000) Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat. Neurosci.* 3, 238–244

Rantamaki T, Hendolin P, Kankaanpaa A, Mijatovic J, Piepponen P, Domenici E, Chao MV, Mannisto PT, Castren E (2007) Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-Cgamma signaling pathways in mouse brain. *Neuropsychopharmacology* 32:2152-2162.

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.

Richtsmeier, J.T., Baxter, L.L., and Reeves, R.H. (2000). Parallels of craniofacial maldevelopment in Down syndrome and Ts65Dn mice. *Dev. Dyn.* 217 , 137 – 145.

Roizen NJ, Patterson D (2003) Down's syndrome. *Lancet* 361:1281-1289.

Rosenstein DL, Nelson JC, Jacobs SC (1993) Seizures associated with antidepressants: a review. *J Clin Psychiatry* 54:289-299.

Roper, R.J., Baxter, L.L., Saran, N.G., Klinedinst, D.K., Beachy, P.A., and Reeves, R.H. (2006). Defective cerebellar response to mitogenic Hedgehog signaling in Down [corrected] syndrome mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 , 1452 – 1456.

Ross, M.H., Galaburda, A.M., and Kemper, T.L. (1984). Down ' s syndrome: is there a decreased population of neurons ? *Neurology* 34 , 909 – 916.

Rueda N, Flórez J. e Martínez-Cué C. (2008), Chronic pentylentetrazole but not donepezil treatment rescues spatial cognition in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. - *Neuroscience Lett.* 5;433(1):22-27

Rueda N., Llorens-Martín M.V., Tejeda G.S., Flórez J., Trejo J.L. e Martínez-Cué C. (2010), Effects



of voluntary physical exercise on adult hippocampal neurogenesis and behavior of Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. – *Neuroscience* 29;171(4):1228-1740

Rueda N., Mostany R., Pazos A., Flórez J. e 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

Sale A., Berardi N., Spolidoro M., Baroncelli L. e Maffei L (2010), GABAergic inhibition in visual cortical plasticity. – *Front. Cell. Neurosci.* 31(4):10

Sale A., Maya Vetencourt, J. F., Medini P., Cenni M. C., Baroncelli L., De Pasquale R., e Maffei L. (2007), Environmental enrichment in adulthood promotes amblyopia recovery through a reduction of intracortical inhibition. - *Nat. Neurosci.* 10:679-681

Salehi A., Faizi M., Colas D., Valletta J., Laguna J., Takimoto-Kimura R., Kleschevnikov A., Wagner SL, Aisen P, Shamloo M., Mobley WC. Restoration of norepinephrine-modulated contextual memory in a mouse model of Down syndrome. *Sci Transl Med.* 2009 Nov 18;1(7):7ra17. doi: 10.1126/scitranslmed.3000258.

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.

Scali M, Begenisic T, Mainardi M, Milanese M, Bonifacino T, Bonanno G, Sale A, Maffei L. Fluoxetine treatment promotes functional recovery in a rat model of cervical spinal cord injury. *Sci Rep* 2013.:2217

Schapiro, M.B., Creasey, H., Schwartz, M., Haxby, J.V., White, B., Moore, A., and Rapoport, S.I. (1987). Quantitative CT analysis of brain morphometry in adult Down ' s syndrome at different ages. *Neurology* 37 , 1424 – 1427.

Schmidt-Sidor, B., Wisniewski, K.E., Shepard, T.H., and Sersen, E.A. (1990). Brain growth in Down syndrome subjects 15 to 22 weeks of gestational age and birth to 60 months. *Clin.Neuropathol.* 9 , 181 – 190.

Schulz, E. and Scholz, B. (1992). Neurohistological findings in the parietal cortex of children with chromosome aberrations. *J. Hirnforsch.* 33 , 37 – 62.

Schulz, J.B., Weller, M., and Moskowitz, M.A. (1999). Caspases as treatment targets in stroke and neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.* 45 , 421 – 429.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, (2001) *The metabolic and molecular bases of inherited disease* 8th ed New York: McGraw Hill. Pp1223-1256.

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.

Seo H. e Isacson O. (2005), Abnormal APP, cholinergic and cognitive function in Ts65Dn Down's model mice. – *Exp. Neurol* 193(2):469-480

Seregaza Z, Roubertoux PL, Jamon M, Soumireu-Mourat B (2006) Mouse models of cognitive disorders in trisomy 21: a review. *Behav Genet* 36:387-404.

Shah, S.N. (1979). Fatty acid composition of lipids of human brain myelin and synaptosomes: changes in phenylketonuria and Down ' s syndrome. *Int. J. Biochem.* 10 , 477 – 482.

Shin, M., Besser, L.M., Kucik, J.E., Lu, C., Siffel, C., and Correa, A. (2009). Prevalence of Down syndrome among children and adolescents in 10 regions of the United States. *Pediatrics* 124, 1565 – 1571.

Siarey R.J., Carlson E.J., Epstein C.J., Balbo A., Rapoport S.I. e Galdzicki Z. (1999), Increased synaptic depression in the Ts65Dn mouse, a model for mental retardation in Down syndrome. - *Neuropharmacology* 38(12):1917-1920

Siarey R.J., Stoll J., Rapoport S.I., Galdzicki Z. (1997), Altered long-term potentiation in the young and old Ts65Dn mouse, a model for Down Syndrome. – *Neuropharmacology* 36(11-12):1549-4554

Silva AJ, Ehninger D (2009) Adult reversal of cognitive phenotypes in neurodevelopmental disorders. *J Neurodev Disord* 1:150-157.

Stadelmann, C., Deckwerth, T.L., Srinivasan, A., Bancher, C., Bruck, W., Jellinger, K., and Lassmann, H. (1999). Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer ' s disease. Evidence for apoptotic cell death. *Am. J. Pathol.* 155 , 1459 – 1466.

Stagni F, Magistretti J, Guidi S, Ciani E, Mangano C, Calza 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.

Stewart, L.S. (2007). Chronobiometry of Behavioral Activity in the Ts65Dn Model of Down Syndrome. *Behav. Genet.* 37, 388 – 398.

Stoel Gammon, C. (2001). Down syndrome phonology: developmental patterns and intervention strategies. *Downs Syndr. Res. Pract.* 7, 93 – 100.

Suchard JR (2008) Fluoxetine overdose-induced seizure. *West J Emerg Med* 9:154-156.

Wang C, Zucker RS (1998) Regulation of synaptic vesicle recycling by calcium and serotonin. *Neuron* 21:155-167.

Sudarov, A. and Joyner, A.L. (2007). Cerebellum morphogenesis: the foliation pattern is orchestrated by multi-cellular anchoring centers. *Neural. Dev.* 2 , 26.

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.

Sugiyama S., Di Nardo A.A., Aizawa S., Matsuo I., Volovitch M., Prochiantz A. e Hensch T. K. (2008), Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. - *Cell* 134:508–520

Suttle C.M. e Lloyd R.. (2005), Chromatic and achromatic transient VEPs in adults with Down syndrome. – *Ophthalmic. Physiol.* 25(6):501-513

Suttle C.M. e Turner A.M. (2004), Transient pattern Visual Evoked Potentials in children with Down's syndrome. - *Ophthalmic and Physiological Optics* 24 (2):91–99

Sylvester, P.E. (1986). The anterior commissure in Down ' s syndrome. *J. Ment. Defi c. Res.* 30 (Pt1), 19 – 26.

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.

Tamagno, E., Robino, G., Obbili, A., Bardini, P., Aragno, M., Parola, M. and Danni, O. (2003). H2O2 and 4-hydroxynonenal mediate amyloid beta-induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38MAPK. *Exp. Neurol.* 180, 144–155.

Teipel, S.J., Schapiro, M.B., Alexander, G.E., Krasuski, J.S., Horwitz, B., Hoehne, C., Moller, 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.

Terry AV Jr. Spatial Navigation (Water Maze) Tasks. Authors In: Buccafusco JJ, editor. *Source Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press; 2009. Chapter 13.

Turner C.A., Presti M.F., Newman H.A., Bugenhagen P, Crnic L. e Lewis M.H. (2001), Spontaneous stereotypy in an animal model of Down syndrome: Ts65Dn mice. – *Behav. Genet.* 31(4):393-400

Van Praag H., Kempermann G. e Gage F.H. (2000), Neural consequences of environmental enrichment.- *Nat. Rev. Neurosci.* 1(3):191-198

Vicari, S. (2006). Motor development and neuropsychological patterns in persons with Down syndrome. *Behav. Genet.* 36 , 355 – 364.

Vicari, S., Bellucci, S., and Carlesimo, G.A. (2000). Implicit and explicit memory: a functional dissociation in persons with Down syndrome. *Neuropsychologia* 38 , 240 – 251.

Vuksic, M., Petanjek, Z., Rasin, M.R., and Kostovic, I. (2002). Perinatal growth of prefrontal layer III pyramids in Down syndrome. *Pediatr. Neurol.* 27 , 36 – 38.

Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.V., Cullen W.K., Anwyl R., Wolfe M.S., Rowan M.J. e Selkoe D.J. (2002), Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. - *Nature* 416(6880):535-539

Wang, J.W., David, D.J., Monckton, J.E., Battaglia, F., and Hen, R. (2008). Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *J. Neurosci.* 28 , 1374 – 1384.

Wang, P.P., Doherty, S., Hesselink, J.R., and Bellugi, U. (1992). Callosal morphology concurs with neurobehavioral and neuropathological findings in two neurodevelopmental disorders. *Arch. Neurol.* 49 , 407 – 411.

Weis, S., Weber, G., Neuhold, A., and Rett, A. (1991). Down syndrome: MR quantification of brain structures and comparison with normal control subjects. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 12 , 1207 – 1211.

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.* 61 , 59 – 70.

Westmark CJ, Westmark PR, Malter JS (2010) Alzheimer's disease and Down syndrome rodent models exhibit audiogenic seizures. *J Alzheimers Dis* 20:1009-1013.

White, N.S., Alkire, M.T., and Haier, R.J. (2003). A voxel-based morphometric study of nondemented adults with Down Syndrome. *Neuroimage* 20 , 393 – 403.

Wilson MA, Tonegawa S (1997). Synaptic plasticity, place cells and spatial memory: study with second generation knockouts. *Trends Neurosci.* 1997 Mar;20(3):102-6.

Winter, T.C., Ostrovsky, A.A., Komarniski, C.A., and Uhrich, S.B. (2000). Cerebellar and frontal lobe hypoplasia in fetuses with trisomy 21: usefulness as combined US markers. *Radiology* 214 , 533 – 538.

Wisniewski, K., Howe, J., Williams, D.G., and Wisniewski, H.M. (1978). Precocious aging and dementia in patients with Down 's syndrome. *Biol. Psychiatry* 13 , 619 – 627.

Wisniewski, K.E. (1990). Down syndrome children often have brain with maturation delay, retardation of growth, and cortical dysgenesis. *Am. J. Med. Genet. Suppl.* 7 , 274 – 281.

Wisniewski, K.E. and Schmidt-Sidor, B. (1989). Postnatal delay of myelin formation in brains from Down syndrome infants and children. *Clin. Neuropathol.* 8 , 55 – 62.

Wisniewski, K.E., Dalton, A.J., McLachlan, C., Wen, G.Y., and Wisniewski, H.M. (1985a). Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies. *Neurology* 35 , 957 – 961.

Wisniewski, K.E., Wisniewski, H.M., and Wen, G.Y. (1985b). Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer ' s disease in Down ' s syndrome. *Ann. Neurol.* 17 , 278 – 282.

Xiang Z, Prince DA (2003) Heterogeneous actions of serotonin on interneurons in rat visual cortex. *J Neurophysiol* 89:1278-1287.

Zienowicz M, Wislowska A, Lehner M, Taracha E, Skorzewska A, Maciejak P, Plaznik A (2005) The effect of fluoxetine in a model of chemically induced seizures--behavioral and immunocytochemical study. *Neurosci Lett* 373:226-231.