



Universidad Nacional Autónoma de México

PROGRAMA ÚNICO DE ESPECIALIZACIONES EN PSICOLOGÍA

**EFFECTO DEL CONSUMO DEL COMPLEMENTO ALIMENTICIO T-2 EN
PARADIGMAS CONDUCTUALES ASOCIADOS A MEMORIA Y ANSIEDAD**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN NEUROBIOLOGÍA DE LA CONDUCTA**

PRESENTA:

MAYRA ITZEL TORRES FLORES

DIRECTOR:

**DR. OCTAVIO GARCÍA GONZÁLEZ
FACULTAD DE PSICOLOGÍA**

COMITÉ:

**DR. J. FERNANDO PEÑA ORTEGA
FACULTAD DE PSICOLOGÍA
DRA. CLAUDIA GÓMEZ ACEVEDO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA
DRA. BEATRIZ GÓMEZ GONZÁLEZ
FACULTAD DE PSICOLOGÍA
MTRA. AZALEA REYES AGUILAR
FACULTAD DE PSICOLOGÍA**

México D.F.

Noviembre 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurobiología del Síndrome de Down de la Facultad de Psicología de la UNAM.

Para la realización del mismo, se contó con el apoyo del proyecto PROINNOVA-CONACYT *“Neuroalimentación como apoyo al desempeño fisiológico y en las habilidades cognitivas en personas con trisomía 21, trastornos del espectro autista y trastorno por déficit de atención”*.

Se hace un reconocimiento especial a la Dra. Laura Colín Barenque de la FES-Iztacala, UNAM; Biol. Ivonne Sánchez Cervantes y Biol. Irma López Martínez de la Facultad de Medicina, UNAM, por el apoyo en la realización y análisis de la técnica Golgi rápido. De igual manera se reconoce de manera especial al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por la orientación y apoyo para la obtención de los dibujos por cámara lúcida.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Ciencias y Humanidades, a la Universidad Nacional Autónoma de México, por todos los matices en la enseñanza y mi formación académica.

A mis maestros Judith Orozco y Jorge Gardea por ser parte fundamental en mi formación académica y personal.

A mis profesores Azalea Reyes, Gerardo Ortiz, Gabriel Gutiérrez Ospina, por todas las enseñanzas, por el amor a mi área de estudio y la paciencia.

Al Dr. Ranier Gutiérrez por mostrarme un mundo fuera de la UNAM, y enseñarme que es hacer investigación.

A la Dra. Claudia Gómez Acevedo, por toda la ayuda y enseñanza

A mi director de tesis Dr. Octavio García, por mostrarme el tipo de investigador que quiero ser.

A mi sinodales Dr. Fernando Peña y Dra. Beatriz Gómez, por todas las observaciones y el tiempo invertido para hacer de este un buen trabajo. A la Dra. Sofía Rivera por todo el apoyo

DEDICATORIAS

Me es muy complicado resumir y escribir a toda la gente a quien me gustaría agradecer y dedicarle esta tesis. Así que, como diría la liebre de Marzo: “comenzaré por el comienzo”, sin que ello represente un valor cualitativo o cuantitativo de lo mucho que les agradezco a todos.

A mamá, Olivia Flores, por enseñarme la importancia de reír, a disfrutar de las cosas más diminutas y del trabajo duro y apasionado, así como por las correcciones de estilo. A papá, Martín Torres, por mostrarme la importancia del trabajo, pero sobre todo por creer incondicionalmente en mí. A mi hermano, Ángel Torres, por todos los días desde que sé de su existencia y por mostrarme que es importante ser siempre uno mismo. A mis hermanos mayores: Olinca, gracias a ti aprendí que no importa lo difícil que parezca, uno siempre puede hacerlo; Emilio, por los dibujos, por la música pero encima de todo por el amor al conocimiento y la entrega al mismo. A mis tías: Dulce, por todos los cocos y mostrarme la importancia de amar sin medida; Alma, por el apoyo incondicional, por mostrarnos siempre lo importante que es ocuparse y no preocuparse y a reírme del mundo y de mí misma; Gaby, por estar siempre aquí y darme un espíritu que me enseñó a caminar y yo a hablar (siempre en mi corazón). A mi abu Helena, por toda ella, los cuidados y el amor.

A Norma, Analleli, Luis, Jessica y Joaquín, por ayudarme a sobrevivir la secundaria y seguir conmigo.

A mis tres fantásticos y mi familia por elección: Diana, Carlos y Aarón, chicos que les puedo decir que no nos hayamos dicho muchas veces de tantas maneras, con y sin palabras. Gracias por hacer del CCH una de las mejores épocas de mi vida, por creer en mí (por hacer que creyera en mí); por querernos así, sin una razón, por estar conmigo a pesar de todo, a pesar del tiempo, a pesar de cómo el mundo ha cambiado. Gracias por mostrarme la diversidad del mundo, por las chelas, las aventuras, los regaños, las risas y por ser ustedes. Ustedes hicieron de mí lo que soy y no podría estar más agradecida! (sigue en pie lo de ese bar en la playa!). Y a toda mi familia extendida: Chema por las risas, la confianza, los regaños; Ale, por mostrarme lo importante que es seguir lo que creo. Al Partner, let's go to the match, partner!, Erik gracias por todo el apoyo, por las platicas debrayadas, por escuchar y dejarme ser parte de su vida. A Olman, por mostrarme que no debo temerle a mis decisiones. A Ame, you know why. A Marita, Catarina, hormiguita, de verdad esto no podría haberlo hecho sin ti. Gracias por escuchar y entender, y seguir escuchando y seguir entendiendo, gracias por Grieg, por Ibsen, por Hume, por los desvaríos, por las chaquetas mentales, por los desamores, por creer en mí y sobre todo por hacer del mundo, un lugar mejor para vivir.

A mis amigos de psicología Gabiririta, Coral, Omar, Marisol, Jorge, Loreto, Jimena, gracias por la diversidad de ideas, por los ratitos (aunque chiquitos) de ocio y ñoñes. Por hacer de mi carrera un mundo complejo, lleno de recovecos que explorar y no dejarme casar con una Psicología. A mis compañeras especiales Octavia y Mónica, hicieron de este experimento un momento menos tortuoso y más interesante. A Yennnnniiii y a Wennnnndiiii, por el viaje a San Diego, por escuchar y los seminarios espontáneos, por reencontrarme con mi amor con la investigación.

A mis compañeros del laboratorio David y Susu: lo logramos!. David gracias por el apoyo, los comentarios y el escuchar mis quejas. Susu, no podría haberlo hecho sin ti, gracias por las mañanas del domingo, por los “ahhh! Un ratón!” (Aún cuando trabajamos en un bioterio), por los Golgis, por todas las María Antonietas; e igual de importante, por dejarme entrar y poder compartir.

A mi mamá académica, Dra. Claudia Gómez Acevedo. Doctora, no encuentro palabras que expresen todo el amor y agradecimientos que le tengo, gracias por recoger a esta vagabunda, por darme un lugar donde trabajar, por confiar en mí aún sin conocerme, por ser un maestro excepcional, por mostrarme el tipo de persona que quiero ser (en la ciencia, en la vida, con el mundo), y por dejarme hacerla sentir orgullosa.

A mis otros compañeros del laboratorio: David, no habría llegado a conocerlos sin ti. A Nuria, por las quejas compartidas y el apoyo. A Lis y a Luis, por dejarme abandonada en San Diego y mostrarme que puedo sobrevivir a batos fronterizos, por las discusiones de neurotransmisores, por estar conmigo y escuchar, por empujar esta tesis, por un laboratorio divertido (un día todos de nuevo en un laboratorio cambiaremos, sino el mundo, si la forma de hacer investigación).

Al Museo de la Luz, por ser mi refugio, un parte aguas en mi vida y traerme de vuelta a mí misma. A mis pobres morros, Lorena (mi morra), Mary Paz (Chola), Miguel (pancita) por ser una generación pequeña y rota, por las risas, las tonterías, por escuchar aunque no me entendieran, por apoyarme y creer en mí, los quiero babys!. A mis otros babys, Manuel y Flaherty, hicieron del museo junto con los pobres morros, un lugar al que adoraba ir, gracias por los abrazos, las risas, las historias (tantos chismes picosos), por no dejarme caer y por mostrarme lo hermoso que es conocer cosas nuevas, cosas que no entiendo, por ayudarme a dejarme ser! .A mí ahijado Miguel, por dejarme ser parte de su vida. Y a todos los demás que hicieron del museo otra de las mejores etapas de mi vida, una etapa donde recordé la riqueza y la importancia de la variedad de pensamientos, lo relevante y enriquecedor de esta comunicación sin prejuicios, sin poses y con mucho amor por el saber: Bets, Frank, Moni, Adriana, Lucero, Chío, Anita, Chavelita, Cesar, Omar, Ari, Marcos, a mamá Diego, a papá Jaime y Vianney. A mi coordinadora Yona, por todo el apoyo que me ha dado, por ser una increíble jefa, por las divisiones con casita. Gracias por el conocimiento (si aprendí mucho de futbol), por las risas, los quiuboles, los cachorritos y como lo dije en un principio por traerme de vuelta y hacerme una mejor científica, una mejor divulgadora de las ciencias y un mejor ser humano.

A mis negros, mis pequeños (Hulk a ti también), gracias por todo lo que me enseñaron, aún cuando enloquecían, a todos ustedes los extraño en mi bolsa de la bata o enredados en la bufanda, ustedes saben que intente salvarlos durante ese temblor.

Y a todos aquello que hicieron de mí lo que soy, aun cuando se han ido, aún cuando fueron pasajeros, aún cuando solo conozco sus voces, aún cuando no existen. Gracias

A mi rabo de nube...
Entre historias, adivinos y brujas, lunas espías y castillos en el cielo,
Veo la realidad en la que quiero estar

"The truth does not change because it is, or is not, believed by a majority of the people".
Giordano Bruno

"Siempre hare esos papeles, ya que el mundo nunca entenderá"
Theda Bara

"Aprender a volar es todo un arte. Aunque sólo hay que cogerle el truco. Consiste en tirarse al suelo y fallar"
Douglas Addams

"En general hay un grado de duda, de cautela y modestia que, en toda clase de investigaciones, debe acompañar siempre al razonador cabal."
David Hume

"Un científico en su laboratorio no es solo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas"
Marie Curie

"[Las neuronas son] células de formas delicadas y elegantes, las misteriosas mariposas del alma, cuyo batir de alas quién sabe si esclarecerá algún día el secreto de la vida mental."
Santiago Ramón y Cajal

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS	i
RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	6
2.1. La nutrición y el cerebro	6
2.2. Las espinas dendríticas en problemas de neurodesarrollo	8
2.3. Las espinas dendríticas y desnutrición	10
2.4. Las espinas dendríticas y el síndrome de Down	12
2.5. El hipocampo	13
2.5.1.El hipocampo y las dietas	15
2.5.2.El hipocampo y el síndrome de Down	16
2.6. Tratamientos farmacológicos en el síndrome de Down	16
2.7. Tratamientos no farmacológicos en el síndrome de Down	18
2.8. Complemento alimenticio T-2 (T-2)	20
2.8.1. <i>Ingredientes del T-2</i>	20
2.9 Pruebas conductuales asociadas a memoria	25
2.9.1 <i>Reconocimiento de Objetos Novedosos</i>	26
2.9.2 <i>Laberintos</i>	28
2.10 Pruebas conductuales asociadas a ansiedad	29
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. OBJETIVO	32
4.1. Objetivo general	32
4.2. Objetivos específicos	32
5. HIPÓTESIS	33
6. MÉTODO	34
6.1. Sujetos	34
6.1.1. <i>Consumo de T-2</i>	34
6.1.2. <i>Determinaciones fisiológicas</i>	34
6.1.3. <i>Grupos experimentales</i>	35
6.2. Análisis conductual	37
6.2.1. <i>Reconocimiento de objetos novedosos</i>	37
6.2.2. <i>Laberinto acuático en "Y"</i>	39
6.2.3. <i>Laberinto en cruz elevado</i>	40
6.3. Análisis histológico	41
6.3.1. <i>Tinción rápida de Golgi</i>	41
6.3.2. <i>Análisis de espinas dendríticas</i>	42
6.4. Análisis estadístico	43

7. RESULTADOS	45
7.1. Cambios alimenticios	45
7.1.1. <i>El consumo de T-2 produce un aumento en el consumo de líquido</i>	45
7.1.2. <i>El consumo de T-2 produce un aumento en el consumo de alimento sólido</i>	47
7.2. Variables fisiológicas	49
7.2.1. <i>El consumo de T-2 produce un incremento de peso en los ratones</i>	49
7.2.2. <i>El consumo de T-2 produce cambios de talla en los ratones</i>	51
7.3. Efectos conductuales	52
7.3.1. <i>El consumo de T-2 no produce cambios en la ejecución de la prueba de reconocimiento de objetos novedosos</i>	52
7.3.2. <i>El consumo de T-2 no produce cambios en la ejecución de una tarea de memoria espacial</i>	53
7.3.3. <i>Efecto del consumo de T-2 en conductas asociadas a ansiedad</i>	56
7.4. El consumo del T-2 incrementa el número de espinas dendríticas en el hipocampo	57
7.4.1. <i>El consumo de T-2 incrementa la densidad de sinapsis después de dos meses de tratamiento</i>	58
8. DISCUSIÓN	62
8.1. El consumo de T-2 modifica patrones de ingesta	63
8.2. El consumo de T-2 tiene un efecto en variables fisiológicas	64
8.3. El efecto del T-2 en la memoria de reconocimiento y espacial	65
8.4. El efecto del T-2 en la ansiedad	68
8.5. El consumo de T-2 tiene efectos diferenciales en la formación de espinas dendríticas	70
8.6. El T-2 y su interacción con la microbiota intestinal	73
9. CONCLUSIONES	75
10. REFERENCIAS	76

ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICAS Y TABLAS

Figura 1	Características de las espinas dendríticas	8
Figura 2	Espinas dendríticas en diversos trastornos del desarrollo que presentan retraso mental	10
Figura 3	El hipocampo	14
Figura 4	Reconocimiento de objetos novedosos	27
Figura 5	Laberinto en cruz elevado	30
Figura 6	Diseño experimental utilizado en esta tesis	36
Figura 7	Reconocimiento de Objetos Novedosos	38
Figura 8	Laberinto acuático en “Y”	39
Figura 9	Laberinto en cruz elevado	41
Figura 10	El consumo de T-2 modifica la ingesta de líquido	46
Figura 11	El consumo de T-2 disminuye el consumo de pellet	48
Figura 12	El consumo del T-2 incrementa el peso en los ratones	50
Figura 13	El consumo del T-2 incrementa la talla en los ratones	51
Figura 14	El consumo de T-2 no produce cambios en la memoria de reconocimiento	53
Figura 15	Latencia a la plataforma en laberinto acuático en “Y”	54
Figura 16	Porcentaje de tiempo en el brazo correcto	55
Figura 17	Laberinto en cruz elevado	56
Figura 18	El consumo de T-2 no modifica la densidad de las espinas después de 1 mes de tratamiento	57
Figura 19	El consumo de T-2 produce un aumento de la densidad de las espinas después de 2 meses de tratamiento	58
Figura 20	Efecto de T-2 en animales expuestos a reconocimiento de objetos novedosos	59
Figura 21	Efecto de T-2 en animales expuestos a laberinto acuático en “Y”	60
Figura 22	Espinas durante el tratamiento	61

RESUMEN

El cerebro es un órgano especialmente sensible a las modificaciones en el aporte nutricional, por lo que un deterioro nutricional puede causar modificaciones en la micro y la macroarquitectura cerebral, afectando el desarrollo intelectual. Por otra parte, el uso de dietas específicas para mejorar habilidades cognitivas en personas con problemas de neurodesarrollo ha tenido cierto éxito. Se demostró que el consumo del complemento alimenticio T-2 en personas con síndrome de Down mejoró aspectos cognitivos como la memoria, la atención y redujo los niveles de ansiedad; no obstante, se desconocen los mecanismos celulares y moleculares a través de los cuales el T-2 induce estas mejoras.

Este trabajo tuvo como objetivo conocer el efecto del consumo del T-2 sobre diversas pruebas conductuales y en la formación de espinas dendríticas en ratones. Ratones de la cepa C57BL/6 consumieron el T-2 durante sesenta días, periodo en el que fueron expuestos a las tareas de memoria: reconocimiento de objetos novedosos, laberinto acuático en “Y”; así como a una prueba para medir ansiedad: laberinto en cruz elevado. Los ratones fueron sacrificados y los cerebros procesados para tinción rápida de Golgi, a fin de conocer el efecto del T-2 sobre las espinas dendríticas.

Los resultados mostraron que los ratones que consumieron el T-2 no presentaron cambios en la ejecución de las tareas conductuales, pero se observó un aumento en la densidad de espinas dendríticas. Estos resultados sugirieron que los efectos del T-2 podrían estar asociados con la formación de espinas dendríticas.

ABSTRACT

The brain is especially sensitive to modification in nutritional contribution; nutritional deficits cause modifications in the brain micro and macroarchitecture and affect the intellectual development. On the other hand, the improvement of cognitive abilities in developmental disorders using specific diets has had some success. It has been proved that intake of supplement T-2 by persons with Down syndrome; improve cognitive aspect, such as memory, attention, and also reduced anxiety levels. However the cellular and molecular mechanisms by which T-2 induces this improvements are unknown.

The aim of this work was knew the effect of T-2 over different behavioral test and dendritic spines formation. To which, C57BL6 mice consume T-2 during sixty days, in this period the animals was expose to memory task: novel object recognition test and aquatic "Y" maze; and to an anxiety test: plus elevated maze. Also, the mice were sacrificed and the brain processed to rapid Golgi staining, in order to known the effect over dendritic spines of T-2.

The results shown that mice that intake T-2 had not improvement on behavioral test execution, however was observed an increase of dendritic spines density. The results suggest that effect of T-2 could be associated to the dendritic spines formation.

1. INTRODUCCIÓN

La nutrición es un factor clave para el desarrollo y funcionamiento adecuado del sistema nervioso central (Benton, 2010a). Un deterioro en el suministro de nutrientes puede afectar el desarrollo cognitivo de las personas y favorecer el retraso mental (Benton, 2010b). Las deficiencias nutricionales afectan procesos como la migración y la diferenciación celulares (Morgane et al., 1993), el desarrollo de las sinapsis y los árboles dendríticos (Andrade, Castanheira-Vale, Paz-Dias, Madeira & Paula-Barbosa, 1996); y la síntesis de neurotransmisores (Blanquet, 2000). Particularmente, los cambios en la composición de las dietas alteran el desarrollo y mantenimiento de las espinas dendríticas (Benítez-Bribiesca, De la Rosa-Alvarez & Mansilla-Olivares, 1999; Cintra, Díaz-Cintra, Galván, Kemper & Morgane, 1990; Gundappa & Desiraju, 1988), lo que sugiere que existe una alta sensibilidad de las espinas dendríticas a los componentes de una dieta.

Las espinas dendríticas, descritas por Santiago Ramón y Cajal a finales del siglo XX, son pequeñas protuberancias que emergen de las dendritas de la neurona y son consideradas los principales sitios de sinapsis excitatorias (García-López, García-Marín & Freire, 2007). Las anomalías en el número y la morfología de las espinas, se asocian al retraso mental en la desnutrición (Benítez-Bribiesca et al., 1999; Díaz-Cintra, García-Ruiz, Corkidi, & Cintra, 1994; Kemper, Pasquier, & Drazen, 1978), y diversos síndromes de origen genético como: síndrome de Down (Benavides-Piccione et al., 2004); síndrome de Rett (Chapleau et al., 2009); síndrome del X frágil (Comery et al., 1997; Cruz-Martín, Crespo & Portera-Cailliau, 2010); síndrome de Williams (Galaburda, Wang, Bellugi, & Rossen, 1994; Meng et al., 2002) y el retraso mental causado por anomalías metabólicas como la fenilcetonuria (Kaufmann & Moser, 2000). La evidencia

señala que las alteraciones en las espinas pueden modificar los circuitos neuronales involucrados en los procesos cognitivos y producir una disfunción intelectual (Dierssen & Ramakers, 2006; Kaufmann & Moser, 2000).

El síndrome de Down, es una de las alteraciones más comunes del neurodesarrollo y la principal causa de discapacidad intelectual (Pulsifer, 1996; Stoll, Alembik, Dott & Roth, 1990). Dentro de la neuropatología del síndrome de Down, se reporta una hipocelularidad en estructuras cerebrales como el cerebelo (Schmidt-Sidor, Wisniewski, Shepard & Sersen, 1990), el hipocampo (Jernigan, Bellugi, Sowell, Doherty, & Hesselink, 1993; Kesslak, Nagata, Lott & Nalcioglu, 1994) y la corteza prefrontal (Lögberg & Brun, 1993). Estas alteraciones están relacionadas con un déficit en la ejecución de tareas cognitivas y motoras. Particularmente, se observa que el hipocampo de personas con síndrome de Down tiene alteraciones en la morfología y densidad de las espinas dendríticas, especialmente en la región CA1 (Dierssen & Ramakers, 2006), hipocelularidad granular y sinaptogénesis anormal (Rachubinski, Crowley, Sladek, Maclean, & Bjugstad, 2012). Estas alteraciones en el hipocampo se han ligado con un mal desempeño en tareas asociadas a memoria espacial (Mangan, 1992), problemas en la consolidación de la información y la producción de mapas espaciales sobre todo en lo referente a memoria de largo plazo (Pennington, Moon, Edgin, Stedron & Nadel, 2003). Estas observaciones han sido confirmadas en modelos de ratón de síndrome de Down, como el Ts65Dn, donde anomalías anatómicas en el hipocampo producen alteraciones en la producción de potenciación a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés) y depresión a largo plazo (LTD por sus siglas en inglés), deficiencias en la resolución de pruebas conductuales asociadas a memoria y

aprendizaje, como en el laberinto de agua de Morris, el laberinto radial y la prueba de aprendizaje de discriminación de contexto (Hyde, Hoplight, & Denenberg, 1998).

El síndrome de Down cursa con niveles altos de estrés oxidativo (Helguera et al., 2013), estudios in vitro han reportado que este nivel alterado de estrés oxidativo conducen a apoptosis (Cramer & Galdzicki, 2012; Jovanovic, Clements, & MacLeod, 1998). Además, como consecuencia de las anomalías cromosómicas del síndrome, se reportan alteraciones en la absorción y metabolismo de ciertos nutrientes (Pueschel, 1992). Por ejemplo, pacientes con síndrome de Down muestran deficiencias en Vitamina A, debido a un decremento drástico en su absorción; también presentan bajos niveles de zinc en plasma (Pueschel, 1992). La inserción de antioxidantes, como la vitamina E (Parisotto et al., 2014); o de nutrientes faltantes como el zinc (Chiricolo, Musa, Monti, Zannoti, & Franceschi, 1993), han permitido reducir el estrés oxidativo y mantener la integridad del DNA. Los datos anteriores sugieren que las intervenciones nutrimentales pueden ayudar a la homeostasis y mejorar la calidad de vida de los pacientes con síndrome de Down.

Diversos tratamientos farmacológicos se han utilizado para incrementar el estado de salud de las personas con síndrome de Down. Entre los tratamientos farmacológicos probados en modelos animales, se ha administrado el péptido vasoactivo intestinal (VIP por sus siglas en inglés), el cual estimula la liberación de factores neurotróficos; y la memantina que mejora los déficits de aprendizaje e incrementa los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF por sus siglas en inglés); también se han administrado inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS), que incrementan la proliferación y supervivencia de neuronas del

giro dentado (GD) (Ruparelia, Pearn & Mobley, 2012). Sin embargo, los tratamientos farmacológicos pueden no tener el impacto deseado y producir efectos secundarios adversos, por ejemplo: la administración de pentilenetetrazolona (PTZ), en el modelo Ts65Dn (Rueda, Flórez, & Martínez-Cué, 2008) mejora la memoria espacial, pero genera convulsiones (Buckley & Sacks, 2007); por lo que el desarrollo de terapias no farmacológicas se presenta como una buena alternativa para los pacientes con síndrome de Down.

Dentro de las terapias no farmacológicas utilizadas en personas con síndrome de Down destacan, la estimulación física, programas de educación especial y dietas específicas (de la Torre & Dierssen, 2012). Particularmente se ha observado que dietas basadas en el consumo de antioxidantes y ácido fólico en niños con síndrome de Down pueden disminuir algunos de los déficits cognitivos de estos pacientes (Ellis, Woodley-Zanthos & Dulaney, 1989). En modelos animales de síndrome de Down que han sido suplementados con dietas a base de colina y antioxidantes, se optimizan la resolución en tareas de atención y memoria (Moon et al., 2010), por otro lado la memoria espacial mejora en animales de la cepa Ts65Dn con dietas ricas en antioxidantes y ácido fólico (Lockrow et al., 2009; Shichiri et al., 2011).

En otros trastornos del desarrollo también se utilizan dietas específicas como terapia no farmacológica, en el autismo (Mulloy et al., 2010; Reichelt, Ekrem, & Scott, 1990) dietas estrictas libres de gluten y caseína, incrementaron el uso del lenguaje y comunicación, la atención, la coordinación motora y reducen las conductas autolesivas, las conductas estereotipadas y la hiperactividad (Whiteley et al., 2012).

Por lo anterior, resulta pertinente explorar el uso de dietas particulares para tratar de reducir alteraciones cognoscitivas asociadas a trastornos del desarrollo, como en el caso del síndrome de Down.

Recientemente se desarrolló el complemento alimenticio T-2 (T-2). El T-2 está compuesto de diversos azúcares como: isomaltosa, eritritol, fructo-oligosacaridos, inulina, antioxidantes contenidos en la linaza (Omega 3, Omega 6 y Omega 9); vitamina B6 (hidrocloruro de piridoxina); complejo de calcio, suero de leche y compuestos de origen vegetal como stevia, cocoa y Luo Han Guo. Estudios piloto demuestran que el consumo del T-2 por pacientes con síndrome de Down disminuye los niveles de ansiedad y agresividad, mejora su desarrollo motor, atención y calidad de sueño. Resultados preliminares de nuestro grupo de investigación sugieren que las mejorías observada en los pacientes, puede asociarse a cambios en los niveles de las aminas biogénicas, los ácidos grasos y un aumento en la microbiota intestinal. No obstante, se desconocen los mecanismos celulares que subyacen a las mejorías descritas, así como su efecto sobre otras conductas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue conocer el efecto del T-2 en paradigmas conductuales asociados a memoria y ansiedad y determinar sí su consumo produce cambios en las espinas dendríticas.

2. ANTECEDENTES.

2.1. La nutrición y el cerebro

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés), la nutrición se define como: la ingesta de alimentos con relación a las necesidades dietéticas del organismo (WHO, 2014). Sin embargo, la deficiencia del consumo de alimentos genera dos tipos de patologías: malnutrición y desnutrición.

La malnutrición, se produce por una dieta con deficiencias nutricionales específicas (anemia) o por un exceso en la utilización de nutrientes específicos. Por su parte la desnutrición, es causada por una ingesta inadecuada en la cantidad de nutrientes que proporcionan energía (Saunders, Smith, & Stroud, 2011). Una alta prevalencia de malnutrición y desnutrición es reportada en la población mundial; siendo esta última, la causa de un tercio de muertes infantiles (Nandy, Irving, Gordon, Subramanian, & Smith, 2005). Particularmente los niños, ancianos y personas con discapacidades físicas y/o intelectuales son más vulnerables a estos déficits, incrementando factores de riesgo fisiológico como: mala absorción de micronutrientes y minerales, reducción en la velocidad metabólica, disminución de apetito, entre otros (Paus, 2010).

La desnutrición y la malnutrición afectan directamente el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso central (Benton, 2010a). Durante el primer trimestre de gestación y los primeros dos años de vida, las deficiencias nutricionales pueden producir en humanos: 1) reducción en el número de neuronas (Dobbing & Smart, 1974); 2) alteración en los procesos de migración y diferenciación celular (Morgane et al., 1993); y 3) problemas en la formación del tubo neural (Pitkin, 2007); en

modelos animales se ha demostrado que causan: 1) menor peso del cerebro al nacer (Smart, Dobbing, Adlard, Lynch, & Sands, 1973); 2) alteración en el desarrollo de las sinapsis y los arboles dendríticos (Andrade et al., 1996; Benítez-Bribiesca et al., 1999) y 3) déficits en la síntesis de neurotransmisores (Blanquet, 2000; Wurtman et al., 2006). Adicionalmente, existe una relación entre la desnutrición y ciertos tipos de retraso mental (Altman, Das, & Sudarshan, 1970; Martin, 1973), sugiriendo la alta vulnerabilidad del cerebro a las alteraciones de la dieta. En investigaciones con ratas, se ha probado que los cambios en la composición de la dieta, causan alteraciones en el desarrollo y mantenimiento de las espinas dendríticas (Cintra et al., 1990; Gundappa & Desiraju, 1988). Estas observaciones concuerdan con un estudio realizado con niños mexicanos que murieron por desnutrición, donde se observó una disminución en la densidad de las espinas dendríticas y alteraciones en la morfología de estas estructuras en la quinta capa de la corteza cerebral (Benítez-Bribiesca et al., 1999), reflejando una alta susceptibilidad de las espinas a los componentes de la dieta. Por otro lado, diversas investigaciones apuntan a que la administración de dietas específicas o balanceo de las mismas, revierten deficiencias nutricionales; en humanos mejoran las deficiencias cognitivas (Benton, 2010b), por su parte en ratas se observa que este tipo de intervenciones son más eficientes si se administran durante las primeras etapas del desarrollo postnatal (José P Andrade, Lukoyanov, & Paula-Barbosa, 2002; Díaz-Cintra et al., 1994), lo cual apunta a que el uso de dietas favorece un mejor desarrollo intelectual, así como a la formación de espinas dendríticas.

2.2. Las espinas dendríticas en problemas de neurodesarrollo

Las espinas dendríticas descritas por Santiago Ramón y Cajal a finales del siglo XX (García-López et al., 2007), son pequeñas protuberancias que emergen de las dendritas de una neurona. Anatómicamente, una espina se compone de una cabeza que se une a la dendrita a través de un tallo o cuello (Salas et al., 2008) (Fig. 1). Las espinas se clasifican de acuerdo a su morfología en espinas redondas, delgadas, en forma de hongo y filipodios y todas las formas pueden estar en la misma dendrita (Hering & Sheng, 2001).

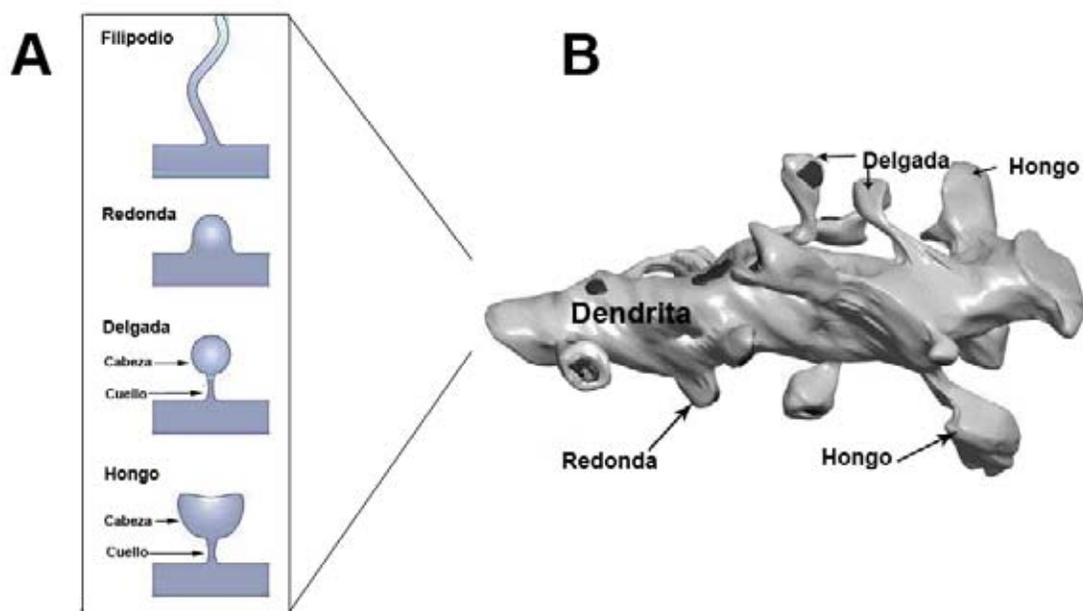


Figura 1. Características de las espinas dendríticas. Se muestra un esquema donde se puede observar los diferentes tipos de espinas dendríticas (A) que pueden existir en una dendrita (B). (Tomado y modificado de Nicoll & Schmitz, 2005; Rochefort & Konnerth, 2012).

La cabeza de las espinas está marcada por un conjunto de proteínas denominado densidad postsináptica (PSD por sus siglas en inglés) (Li & Sheng, 2003; Sheng & Hoogenraad, 2007); son estructuras dinámicas que cambian su forma y volumen continuamente, además contiene gran cantidad de receptores NMDA y AMPA y diversas proteínas ancladas al citoesqueleto (Yasumatsu, Matsuzaki, Miyazaki, Noguchi, & Kasai, 2008).

Las espinas dendríticas son el principal sitio de comunicación entre las neuronas a través de la sinapsis. Un cambio en la densidad y morfología de las espinas dendríticas, causa alteraciones en la fisiología sináptica y modifica la actividad de los circuitos neuronales involucrados en funciones cognoscitivas, ello puede generar diversos grados de retraso mental (Chechlacz & Gleeson, 2003; Dierssen & Ramakers, 2006; Martin, 1973). En este sentido, anomalías en el número y morfología de las espinas dendríticas y sinapsis se asocia al retraso mental (Fig. 2B) reportado en el síndrome de Down (Fig. 2C) (Benavides-Piccione et al., 2004), síndrome de Rett (Chapleau et al., 2009), síndrome del X frágil (Fig. 2D) (Comery et al., 1997; Cruz-Martín et al., 2010), síndrome de Williams (Galaburda et al., 1994; Meng et al., 2002) así como al retraso mental causado por anomalías metabólicas como la fenilcetonuria (Kaufmann & Moser, 2000) y desnutrición (Fig. 2E) (Benítez-Bribiesca et al., 1999; Díaz-Cintra et al., 1994; Kemper et al., 1978).

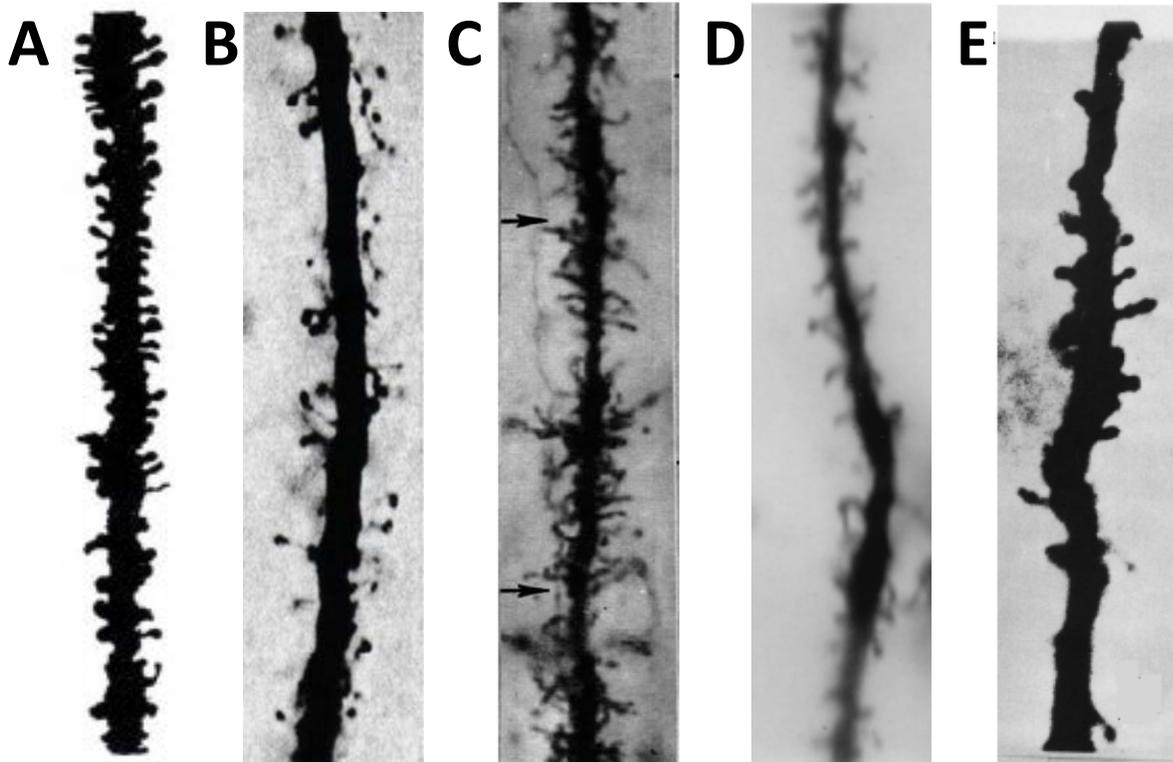


Figura 2. Espinas dendríticas en diferentes trastornos del desarrollo que presentan retraso mental. Imagen que muestra espinas dendríticas en diferentes condiciones del desarrollo A) Sujeto normal (Purpura, 1974); B) Retraso mental de causa no genética (Purpura, 1974); C) síndrome de Down (Marin-Padilla, 1976); D) síndrome de X frágil (Comery et al., 1997) y E) Desnutrición (Benítez-Bribiesca et al., 1999).

2.3. Las espinas dendríticas y la desnutrición

Durante el periodo prenatal, las deficiencias nutricionales afectan la migración y diferenciación neuronal, el desarrollo de espinas dendríticas y sinapsis (Blanquet, 2000). Durante la vida postnatal, estas deficiencias nutricionales, generan una pobre mielinización y arborización dendrítica (Benítez-Bribiesca et al., 1999). Por lo que las

deficiencias nutricionales durante el periodo pre y postnatal tienen un efecto directo en el desarrollo y maduración del sistema nervioso central (Benítez-Bribiesca et al., 1999).

En el cerebro, los efectos de la desnutrición fueron estudiados ampliamente a partir de los años setentas del siglo pasado, tanto en modelos animales como en humanos. En ratas, la deprivación de alimentos disminuye el número de espinas en las células piramidales de la capa 5 de la corteza frontal y occipital presentando una morfología delgada (Salas, Díaz, & Nieto, 1974). También se observa pérdida de espinas en las neuronas piramidales de la corteza somatosensorial, motora, visual y una gran densidad de espinas delgadas (Fiala, Spacek, & Harris, 2002). En modelos animales de malnutrición crónica durante 30 y 90 días, se observa que una reducción en el diámetro y cabeza de las espinas (García-Ruiz, Díaz-Cintra, Cintra, & Corkidi, 1993). Se ha reportado que la desnutrición por la deficiencia de tiamina en ratas, causada por el consumo crónico de alcohol, produce una reducción en el número de espinas; sin embargo, las espinas sobrevivientes estaban alargadas 3-4 veces más de lo normal (Tavares, Paula-Barbosa & Gray, 1983). Ratas con malnutrición inducida por una dieta alta en caseína y baja en calorías muestran un incremento en las espinas dendríticas en regiones las frontal, parietal y entorrinal (Brock & Prasad, 1992).

Por su parte, Benítez-Bibriesca et al. (1999), reportó en tejido cerebral de niños desnutridos dendritas apicales cortas y una menor densidad de espinas dendríticas, las cuales tenían una morfología displásica muy parecida a los filipodios. También se ha observado en humanos que la deficiencia de hormona tiroidea causada por niveles bajos de yodo, puede conducir a la pérdida neuronal y a la pérdida de las espinas dendríticas (Fiala et al., 2002). Todos estos datos en su conjunto sugieren, que las

dietas y/o la deficiencia de nutrientes tienen un efecto directo en la modulación de las espinas dendríticas.

2.4. Las espinas dendríticas y el síndrome de Down

El síndrome de Down, es una de las alteraciones más comunes del neurodesarrollo y la principal causa de retraso mental (Pulsifer, 1996; Stoll et al., 1990). El síndrome de Down es el resultado de un cromosoma extra en el par 21 y se ha asociado con un gran número cambios fenotípicos que incluyen defectos craneofaciales, cardíacos, susceptibilidad a la leucemia, entre otros (Cramer & Galdzicki, 2012).

Dentro de la neuropatología del síndrome de Down, las regiones más afectas debido a la pérdida en el número de neuronas son la corteza prefrontal (Lögberg & Brun, 1993), el cerebelo (Schmidt-Sidor et al., 1990) y el hipocampo (Jernigan et al., 1993; Kesslak et al., 1994). Estas alteraciones se relacionan con el mal desempeño en tareas cognitivas y motoras. En las regiones antes mencionadas, se observan defectos en la corticoneogénesis, reducción en el tamaño del árbol dendrítico en neuronas piramidales y un tamaño reducido en las células del giro dentado en el hipocampo (Benavides-Piccione et al., 2004). Los cerebros adultos con síndrome de Down presentan una reducción en el número de células granulares, así como un incremento de astrocitos y neurodegeneración de los sistemas noradrenérgicos y colinérgicos (Lott & Dierssen, 2010). A partir de los 35 años, los pacientes con síndrome de Down cursan con cambios degenerativos como la acumulación de placas seniles y ovillos

neurofibrilares (Dierssen & Ramakers, 2006), por lo cual la mayor comorbilidad del síndrome de Down son las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Lott & Dierssen, 2010). Se reporta que las personas con síndrome de Down que desarrollan enfermedad de Alzheimer tienen una reducción adicional en el número de espinas dendríticas (Ferrer & Gullotta, 1990)

La alteración en la densidad y morfología de espinas dendríticas, asociada a una disminución en el número de sinapsis afecta la conectividad neuronal y repercute en el grado de discapacidad intelectual presente en individuos con síndrome de Down (Dierssen & Ramakers, 2006; Kaufmann & Moser, 2000). Especialmente, las alteraciones en el hipocampo se relacionan con un mal desempeño en tareas asociadas a memoria espacial (Ellis et al., 1989; Mangan, 1992), las cuales también se reportan en modelos animales de síndrome de Down (Hyde & Crnic, 2001).

2.5. El hipocampo

Una de las estructuras más estudiadas en el sistema nervioso central es el hipocampo, estructura que los miembros de la escuela de Alejandría nombraron como *Cornu ammonis*, por la similitud con los cuernos de Ra. Fue hasta 1564 que Guilo Cesare lo llamó hipocampo por su similitud con el pez tropical (Anderson, Morris, Amaral, Bliss & O'Keefe, 2007). A grandes rasgos, en roedores el hipocampo se puede dividir en hipocampo dorsal y lateral; el hipocampo presenta áreas bien definidas las cuales son el giro dentado (GD) y los cuernos de Amonis (CA), este último se subdividen en regiones (CA1-CA3) (Fig. 3). El hipocampo es una estructura trilaminar

que se compone por el *stratum oriens*, el estrato piramidal y el estrato molecular (Anderson et al., 2007).

El desarrollo del hipocampo se completa durante el periodo posnatal, presenta una gran cantidad sinaptogénesis en la edad adulta y es sumamente sensible a las experiencias, por lo que es una estructura que permite evaluar la eficacia de intervenciones en diferentes periodos y su impacto en el desarrollo cognitivo (Anderson et al., 2007).

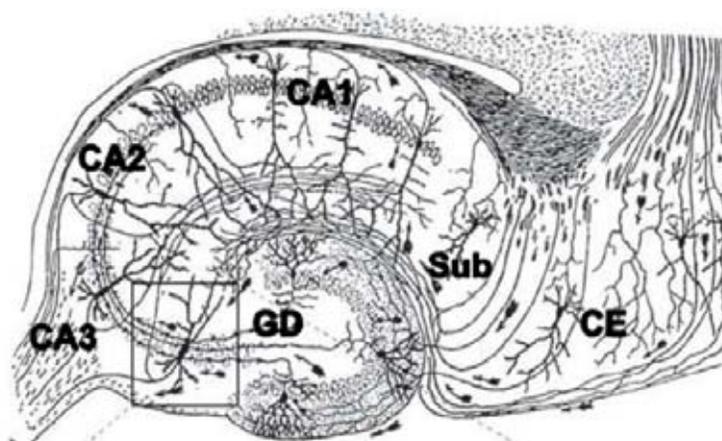


Figura 3. Hipocampo Se muestra dibujo del hipocampo donde se observan las diferentes regiones del hipocampo: **GD** Giro dentado; **CA** Cuernos de Amón, dividido en CA1, CA2 y CA3; **Sub** subículo; **CE** corteza entorrinal (modificación de Nicoll & Schmitz, 2005).

El hipocampo se ha asociado a procesos mnémicos particulares como son la memoria de corto plazo, la memoria de reconocimiento (Winters BD, Saksida LM, 2006) y la memoria espacial (Morris, 1984). La memoria de reconocimiento se considera como parte de la memoria declarativa episódica que se define como una memoria consciente de eventos (memoria de eventos personales) (Squire & Zola, 1998). Este

tipo de memoria, puede ser estudiada a través de pruebas conductuales como es la igualación demorada de la muestra y el reconocimiento de objetos novedosos.

Mientras que la memoria espacial se define como la codificación de la orientación espacial del sujeto. O'Keefe & Dostrovsky (1971), proponen que células piramidales de las regiones CA1 y CA3, conocidas como neuronas de lugar son las responsables de codificar la memoria espacial.

2.5.1. El hipocampo y las dietas

El hipocampo es una estructura sensible a los componentes de la dieta; ejemplo de ello, es que ratas desnutridas pre y postnatalmente presentan pérdida de neuronas hipocampales (Lister et al., 2005). La desnutrición por periodos prolongados afecta la arborización en las colaterales de Schaffer (García-Ruiz et al., 1993), y genera una reducción en el tamaño del soma de las neuronas y en la densidad de espinas dendríticas en la región piramidal CA3 (J P Andrade et al., 1996; García-Ruiz et al., 1993). El efecto de estos daños es dependiente del tiempo que los animales permanecen desnutridos.

Por otro lado, la administración de dietas líquidas o suaves, produce cambios en el hipocampo, ratas con una dieta líquida balanceada desde el destete hasta la edad adulta tienen una reducción en la proliferación de células en el hipocampo (Patten, Moller, Graham, Gil-Mohapel, & Christie, 2013). Estas evidencias sugieren la alta sensibilidad del hipocampo a los componentes de una dieta.

2.5.2. El hipocampo y el síndrome de Down

Pacientes con síndrome de Down tienen daños hipocampales notables que incluyen una hiper celularidad granular y sinaptogénesis anormal (Rachubinski et al., 2012), por lo cual presentan problemas en la consolidación de la información y en la producción de mapas espaciales, sobre todo en lo referente a memoria de largo plazo (Pennington et al., 2003). A través de imagenología se observa una reducción del volumen hipocampal, que se incrementa conforme avanza la edad de los pacientes (Cramer & Galdzicki, 2012). Estas observaciones han sido confirmadas en modelos de ratón de síndrome de Down como el Ts65Dn, donde además se observa una reducción en el número de neuronas y deficiencias en la producción de potenciación y depresión a largo plazo (Cramer & Galdzicki, 2012); así como deficiencias en la ejecución del laberinto de agua de Morris, laberinto radial y la prueba de aprendizaje de discriminación de contexto (Hyde & Crnic, 2001).

2.6. Los tratamientos farmacológicos en el síndrome de Down

Debido a la alta incidencia de la enfermedad de Alzheimer en pacientes con síndrome de Down, muchos de los medicamentos se han orientado a actuar sobre los sistemas de neurotransmisión alterados en la enfermedad de Alzheimer (de la Torre & Dierssen, 2012). Por ejemplo la utilización en humanos de inhibidores selectivos de la acetilcolinoesterasa, como el Donepezil (Aricept®), producen mejorías notables en subtest cognitivos, escalas conductuales, que también son apreciadas por los cuidadores (Spiridigliozzi et al., 2007 citado en de la Torre & Dierssen, 2012). También, ha sido

administrada nicotina para contrarrestar los déficits colinérgicos y estimular la ejecución cognitiva, no obstante las mejorías en el procesamiento de la información y atención solo se han reportado en algunos sujetos (Bernert et al., 2001; Seidl et al., 2000 citado en de la Torre & Dierssen, 2012).

En modelos de ratones trisómicos la utilización de antagonistas del receptor GABA_A ha demostrado que mejora los procesos cognitivos y la depresión a largo plazo (Fernandez & Garner, 2008), por su parte la administración en ratones parcialmente trisómicos del antagonista de los receptores NMDA, memantina, normaliza diferentes daños fenotípicos y déficits cognitivos (Rueda, C., Llorens-Martín, M., Flórez, J., Valdizán, E., Banerjee, P., Trejo, J. L.; Martínez-Cué, 2010). Sin embargo, parece no existir efecto de la memantina en pacientes humanos (Hanney al., 2012 citado en de la Torre & Dierssen, 2012). No obstante, los tratamientos farmacológicos pueden tener efectos adversos, por ejemplo, la administración de pentilenetetrazolona (PTZ) en el ratón trisómico Ts65Dn, aun cuando produce mejorías en la memoria espacial, genera convulsiones (Buckley & Sacks, 2007); por lo que el desarrollo de terapias no farmacológica abre un nuevo campo de investigación para mejorar la calidad vida de los individuos con síndrome de Down.

Dentro de las terapias no farmacológicas, en personas con síndrome de Down han sido probadas: la estimulación física, programas de educación especial (Uyanik, Bumin, & Kayihan, 2003) y dietas específicas, obteniendo diferentes resultados. Debido al incremento en la actividad de las enzimas superóxido dismutasa cobre/zinc (SOD-1), por la triplicación del cromosoma 21, existe un mal funcionamiento de la cistationina β -sintetasa, el cual tiene como resultado una deficiencia en la captación de ácido fólico y

un incremento en la formación de radicales libres, que puede ser disminuido por la administración de vitamina E (Lockrow et al., 2009).

Los pacientes con síndrome de Down pueden cursar con enfermedad célica (Castellví et al., 2008), esta patología también se presentan frecuentemente en los pacientes con autismo (Whiteley et al., 2012). En los pacientes con autismo, se han utilizado dietas estrictas libres de gluten y caseína, para contrarrestar alteraciones conductuales como las conductas autolesivas, la estereotipia, el mejoramiento de coordinación motora y uso del lenguaje (Reichelt et al., 1990; Whiteley et al., 2012).

2.7. Tratamientos no farmacológicos en el síndrome de Down

Debido a las deficiencias en la absorción de nutrientes y a la alta producción de radicales libres en las personas con síndrome de Down, se han utilizado complementos alimenticios ricos en vitaminas y minerales. Sin embargo, el reducido número de estudios no ha permitido tener una conclusión clara sobre este tipo de intervención. En un estudio realizado en pacientes con síndrome de Down por Ellis et al. (2008), se concluyó que la utilización de antioxidantes y ácido fólico, no mejoraba el desarrollo psicomotor o de lenguaje en niños con síndrome de Down. De igual forma, los metabolitos derivados de la carnitina como el Acetil-L-carnitina (Pueschel, 2006), tiene una actividad antioxidante e incrementa la utilización de glucosa, sin embargo cuando es administrada en pacientes con síndrome de Down no mejora el funcionamiento cerebral. En contraposición a estos resultados, en un estudio realizado por De Falco et

al., 1994 (citado en de la Torre & Dierssen, 2012), se reportan mejorías significativas en la memoria visual y atención.

En modelos de ratones parcialmente trisómicos, la utilización del antioxidante SGS-111, reduce la hiperactividad (Rueda, Flórez, & Martínez-Cué, 2008); mientras que la administración de α -Tocoperol, presentan mejorías en tareas relacionadas a memoria espacial y niveles normales de ansiedad (Shichiri et al., 2011).

En modelos animales que sobreexpresan el gen *Dyrk1A*, el cual es un gen involucrado durante el desarrollo con el control del volumen cerebral y densidad celular, un modelo murino de síndrome de Down, la administración del antioxidante galato de epigallocatecina (EGCG), contenido en el té verde, ha sido utilizado para mejorar las alteraciones neuromorfológicas. Además de normalizar los niveles de BDNF, mejora la ejecución en paradigmas asociados a memoria de largo plazo como en el reconocimiento de objetos novedosos (Guedj et al., 2009); además restablece la síntesis de ATP sin presentar un aumento de radicales libres (Valenti et al., 2013).

Finalmente en el ratón *Ts65Dn*, se han utilizado dietas a base de colina para prevenir la degeneración colinérgica propia del síndrome de Down, mejorando la resolución en tareas de atención y memoria (Moon et al., 2010).

Estos trabajos en su conjunto sugieren que el uso de dietas o suplementos vitamínicos pueden ayudar en aspectos cognitivos relacionados a memoria, atención y reducir los niveles altos de estrés oxidativo, tanto en personas como en modelos animales con síndrome de Down.

2.8. El complemento alimenticio T-2 (T-2)

En el año 2011 como parte del proyecto “Neuroalimentación como apoyo al desempeño fisiológico y en las habilidades cognitivas en personas con trisomía 21”, se desarrolló un complemento alimenticio denominado T-2. El proyecto consistió en dotar a las personas con trisomía 21 de una dieta controlada con la finalidad de evitar el sobrepeso y la obesidad en esta población, aunado a ello se buscaba un complemento que permitiera a las personas con síndrome de Down mantener una nutrición adecuada ante los cambios de dieta. El T-2 fue desarrollado a partir de compuestos naturales, azúcares y elementos traza. El complemento solo ha sido administrado en población humana.

2.8.1. Ingredientes del T-2

El T-2 es una fórmula alimenticia con una presentación en polvo que debe ser diluido en agua, saborizado a chocolate. Se sugiere que sea consumido 2 veces al día. El T-2 contiene isomaltosa, eritritol, fructo-oligosacaridos, inulina, Stevia, linaza, vitamina B6, Luo Han Guo, cocoa y suero de leche.

- *Isomaltosa.*

Es un disacárido reducido, es un constituyente natural de la miel del extracto de caña de azúcar. Su fórmula química es $C_{12}H_{22}O_{11}H_2O$. Su capacidad endulzante es similar a la de la sacarosa. Es hidrolizada a glucosa y fructuosa a través de las α -glucosidasas. Produce un menor aumento de la insulina en sangre comparado con la

fructuosa y sacarosa, además de tener un tiempo de absorción más lento (O'Brien, 2001).

- *Eritritol*

Es un alcohol polihídrico, un azúcar pequeño de cuatro carbonos. Se encuentra en frutas tales como uvas, peras y melones, también en hongos y productos fermentados como la salsa de soya y vinos. Su potencial endulzante es 65% mayor que el de la sacarosa. Es fácilmente absorbido por el intestino delgado, no es metabolizado y es rápidamente excretado por la orina (O'Brien, 2001), no afecta la cantidad de glucosa o insulina en plasma (Bern, et al, 1996). El eritritol es resistente al ataque de las bacterias fecales, aún cuando esté en contacto con ellas por 24 horas, por consiguiente, la contribución de energía diaria a través de la fermentación por bacterias del intestino en los humanos es nula (Arrigoni, Brouns, & Amadò, 2007).

Se ha demostrado en estudios in vitro que es un buen atrapador de radicales OH. En estudios con ratas diabéticas se demostró que tiene una buena biodisponibilidad. También se ha probado su capacidad en la prevención del daño oxidativo en las membranas del tejido endotelial (den Hartog et al., 2010). Experimentos con ratas diabéticas muestran que el consumo de eritritol disminuye los niveles de glucosa en plasma y daños en tejido hepático y renal (Yokozawa, Kim, & Cho, 2002). Parte de los efectos adversos son dolor abdominal, diarrea y flatulencia (O'Brien, 2001).

- *Fructo-oligosacaridos.*

Los fructo-oligosacaridos (FOS), son oligo-sacáridos lineales formados por 10-20 monómeros de fructuosa, se encuentran en frutas y vegetales como cebolla, plátano,

ajo, esparrago, y en granos como la cebada y el trigo (Campbell et al., 1997). Pueden ser considerados fibra dietética con un bajo aporte calórico y actúan como sustrato de la microflora intestinal (O'Brien, 2001). Se ha descrito que la ingesta de fructo-oligosacáridos incrementa la absorción de Ca^{2+} y Mg^{2+} , así como la excreción de nitrógeno (van den Heuvel, Muys, van Dokkum & Schaafsma, 1999). La fermentación de los FOS por las bifidobacterias produce cadenas cortas de ácidos grasos, por lo cual la adición de FOS en una dieta rica en carbohidratos reduce la producción de *novo* de ácidos grasos en el hígado (Kaur & Gupta, 2002). Dentro de los FOS se encuentra la inulina, la cual también es parte de los ingredientes del T-2.

- *Inulina*

Es un fructano constituido por 10-60 unidades de fructuosa (Sherman et al., 2009), se considera parte de la fibra dietética y un prebiótico (Kaur & Gupta, 2002). Las bacterias del intestino grueso la degradan en grandes proporciones produciendo ácidos grasos de cadena corta, CO_2 y metano; reduce la gluconeogénesis hepática y no aumenta rápidamente las concentraciones de insulina; no obstante, puede incrementar la reserva de adipocitos (Kaur & Gupta, 2002). En un estudio realizado por Closa-Monasterolo, Gispert-Llaurado, Luque, Ferre & Rubio-Torrents, (2013), se describieron los beneficios de ingerir una fórmula láctea durante cuatro meses en niños recién nacidos suplementada con una combinación de FOS e inulina de cadena larga, con la cual se presentó un aumento de las *Bifidobacterium*, sin que ello produjera diarrea y niveles bajos de hidratación. Por otro lado, este tipo de suplementación no tuvo ningún efecto en los patrones de crecimiento, incluyendo la ganancia de peso, incremento de

la longitud y la circunferencia craneal, tampoco repercutió en mayores concentraciones plasmáticas de colesterol. Además dietas ricas en inulina y oligofruktosa, producen una modulación inmune, incrementan la actividad de células *natural killers* (NK por sus siglas en inglés) y una mayor actividad de fagocitos (Kelly-Quagliana, Nelson, & Buddington, 2003).

- *Stevia*

Stevia rebaudiana es una planta herbácea perenne perteneciente a la familia de las Asteráceas, que crece como arbusto salvaje en el suroeste de Brasil y Paraguay, es rica en glúcidos de diterpeno, llamados esteviósidos (Jarma O., Combatt C., & Claves L., 2010), que son de 110 a 270 veces más dulces que el azúcar (Liu, Li, & Tang, 2010), no eleva los niveles de glucosa en sangre, no aporta calorías, es antiácido, cardiotónico y no produce caries al no ser sintetizado por las bacterias bucales. En estudios realizados en humanos se han reportados propiedades anti-rotavirus y como tratamiento en la diabetes tipo 2 al estimular la secreción de insulina (Abudula, Jeppesen, Rolfsen, Xiao, & Hermansen, 2004; Gregersen, Jeppesen, Holst & Hermansen, 2004).

- *Linaza*

La linaza es la semilla de la planta *Linum usitatissimum*, es nativa de la región que va desde el Mediterráneo hasta la India. De la semilla se extrae aceite, que es rico en Omega 3, Omega 6 y Omega 9 (McKevith, 2005). Los omegas contenidos en el aceite, se relacionan con una mejora cognitiva tanto en condiciones patológicas como la

enfermedad de Alzheimer como en sujetos normales (Gómez-Pinilla, 2010). El omega 3, provee al organismo de ácidos grasos con 22 carbonos y 6 dobles enlaces conocidos como ácido docosahexaenóico (DHA). Un decremento en los niveles de ácido docosahexaenóico durante el desarrollo del cerebro, impedita un buen metabolismo de neurotransmisores, altera el aprendizaje y la función visual (Innis, 2008).

- *Vitamina B6*

Es una vitamina hidrosoluble que se encuentra en huevos, pescado, legumbres, nueces y alimentos ricos en granos integrales. La vitamina B6 interviene en la síntesis de hemoglobina y anticuerpos; así como en la síntesis de ADN y ARN; adicionalmente funciona como coenzima que favorece a la liberación de glucógeno. En el sistema nervioso central interviene en los procesos de mielinización. Las deficiencias de Vitamina B6 tienen efectos neurológicos, sobre todo en deficiencia intelectual y dolor periférico (Nelson & Cox, 2013).

- *Luo Han Guo*

Es una fuente natural de azúcares, compuesto por mogrósidos, los cuales son triterpenos glucósidos, es 300 veces más dulce que el azúcar, no se han reportado efectos tóxicos por su consumo. Además tiene efectos en el sistema inmunológico, originalmente se utiliza como tratamiento del resfriado y la neumonía. Por otro lado no tiene propiedades glicemicas o calóricas (Qin et al., 2006).

Estudios piloto observacionales han demostrado que el consumo del T-2 por pacientes con síndrome de Down disminuye ciertos niveles de ansiedad y agresividad, mejora su desarrollo motor y la atención; por otro lado, a través de electroencefalograma, se ha detectado un aumento en el sueño REM. Resultados preliminares de nuestro grupo de investigación sugieren que la mejoría observada en los pacientes podría estar asociada al restablecimiento de niveles de neurotransmisores y al aumento en la microbiota intestinal. Sin embargo, los mecanismos celulares que subyacen a las mejorías descritas, no se conocen totalmente.

2.9. Pruebas conductuales asociadas a memoria

El aprendizaje es un mecanismo adaptativo que sirve a los animales para poder desplazarse en su medio de manera eficaz, al aprender y recordar aspectos como la ubicación de refugios, fuentes de alimentos y depredadores. Se puede definir al aprendizaje como un cambio perdurable en las respuestas a una situación particular como resultado de las experiencias. Para hacer uso del aprendizaje los organismos necesitan de una memoria que lo evoque. (Domjan, 2003).

La memoria se puede dividir en términos temporales como memoria de corto y largo plazo. La memoria de corto plazo, también conocida como memoria de trabajo, guarda elementos que son transitorios y que controlaran la conducta en un intervalo muy corto (Jeneson & Squire, 2012). Dentro de la memoria de largo plazo se encuentra la memoria implícita, la cual no se recuerda conscientemente y se atribuye generalmente a planes motores (Smith & Kosslyn, 2008; Saunders et al., 2011); y la memoria declarativa, que codifica hechos, ideas y acontecimiento; esta memoria

incluye la memoria semántica, de reconocimiento y la episódica. La memoria episódica se define como los conocimientos de datos temporales, localizados espacialmente, experimentados personalmente y que tienen un contexto específico (Tulving, Donaldson, & Bower, 1972). La memoria declarativa está fuertemente asociada a estructuras temporales mediales como el hipocampo (Winters, Saksida, & Bussey, 2008)

La memoria cuenta con pasos específicos para su codificación, que son: adquisición, retención y evocación. La adquisición es cuando los organismos son expuestos a cierto tipo de información; la retención, es la fase donde se almacena la información y por último la evocación, es el proceso en que se recupera la información adquirida. La mayoría de los estudios de memoria se centran en la fase de evocación y en la variación de los intervalos de retención (Wright, 2007).

Existen pruebas a través de las cuales se pueden medir diferentes tipos de memoria, tales como la prueba de reconocimiento de objetos novedosos, igualación demorada de la muestras, el condicionamiento de preferencia de lugar y los paradigmas que miden conductas de evitación (Buccafusco, 2001).

2.9.1. *Reconocimiento de Objetos Novedosos*

Dentro de los modelos más utilizados para medir memoria declarativa se encuentra la prueba de Reconocimiento de objetos novedosos, en donde se mide la novedad, definida como el cambio en la expectativa ligado a un evento basada en la información previa. Esta prueba fue utilizada por primera vez por Ennaceur y Delacour en 1988. La tarea de reconocimiento de objetos novedosos ha sido propuesta como

una aproximación sencilla que aprovecha la capacidad innata de exploración de los roedores en ausencia de reglas externas o reforzamiento. No requiere de motivación externa o castigo; sin embargo, la memoria que es formada de la tarea es mucho más lábil que la basada en repeticiones (Antunes & Biala, 2012). Esta prueba es utilizada para estudiar memoria de corto plazo. El intervalo de retención es fácilmente manipulable (Tagliabata, Hogan, Zhang, & Dineley, 2009). Cuando esta prueba se presenta en modalidades visuales, se encuentra relacionada con la corteza perirrinal (Hammond, 2004 citado en Antunes & Biala, 2012).

El procedimiento estándar de la tarea de reconocimiento de objetos novedosos, consiste en habituar a un campo abierto a los roedores, después de lo cual son colocados dos objetos idénticos para generar una fase de adquisición o de entrenamiento. Se cuenta con un intervalo de retención, durante el cual los roedores permanecen en su caja habitación y, finalmente, una fase de evocación o de prueba, donde uno de los objetos es cambiado por un objeto novedoso (Fig. 4). En esta tarea, la memoria es medida con un índice de discriminación (Ennaceur, 2010).

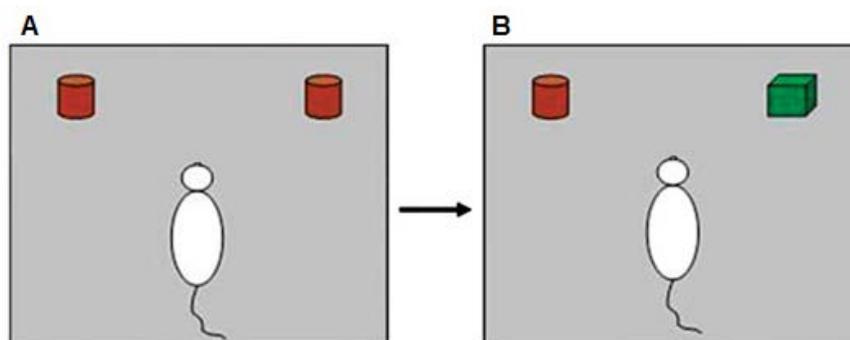


Figura 4. Reconocimiento de objetos Novedosos. Se muestra el procedimiento estándar para la prueba: A) Fase de entrenamiento, se permite al animal explorar dos objetos idénticos; B) Fase de prueba, se permite al animal explorar un objeto conocido y un objeto novedoso.

2.9.2. *Laberintos*

Otras de las pruebas más utilizadas para evaluar el aprendizaje y la memoria en modelos animales son los laberintos, como el laberinto radial, el laberinto de Barnes y laberinto en “T” o “Y”. En estos laberintos se aprovecha la tendencia natural de los roedores para explorar espacios cerrados y pequeños, así como la evitación de espacios abiertos y elevados; por su parte los laberinto acuáticos se sirven de la aversión natural al agua (Montgomery, 1958 citado en Pellow, Chopin, File & Briley, 1985). En 1948, Tolman; propuso que después de un periodo de entrenamiento, los animales pueden establecer estrategias para resolver los laberintos y son capaces de elaborar mapas mentales (Tolman, 1948, citado en Domjan, 2003).

Uno de los laberintos más ampliamente utilizados para medir la habilidad de aprender, recordar y dirigirse a un lugar en un espacio definido es el laberinto de agua de Morris (Buccafusco, 2001; de Bruin, Swinkels, & de Brabander 1997; Miyoshi et al., 2012; Paul, Magda, & Abel, 2009), para resolver este laberinto la participación del hipocampo dorsal es fundamental (Morris, et al, 1982). En este laberinto el parámetro de evocación de memoria más utilizado es la latencia de llegada a la plataforma de escape (Morris, 1984)

Otro procedimiento ampliamente usado es el laberinto en “Y” (Chen et al., 2010; Paul et al., 2009; Pioli et al., 2013; Stanford, 2014). Este laberinto se ha empleado para medir memoria de reconocimiento espacial a través de un paradigma de alternancia (Zhang, 2008). La versión terrestre de este laberinto presenta una serie de problemas, como la gran variabilidad en los estados motivacionales al utilizar comida como reforzador; además puede ser resultado a través de estrategias no espaciales (presencia

de aroma de otros animales, guía de aroma de comida); (Shukitt-Hale, McEwen, Szprengiel, & Joseph, 2004). Una modificación a este laberinto es la presencia de agua, con la cual no se necesita de un reforzador externo y necesita de estrategias espaciales para poder resolverse. Por ello se han planteado versiones acuáticas de diversos laberintos, como el laberinto radial de 8 brazos (Buresová, Bures, Oitzl, & Zahálka, 1985). Autores como Nelson, Lebessi, Sowinski, & Hodges (1997) y Shukitt-Hale et al. (2004) demostraron en rata, que el laberinto radial acuático podría ser útil para evaluar memoria de espacial; no obstante, en un estudio realizado por Hyde et al. (1998) en diferentes cepas de ratón, se reporta que estos roedores pueden llegar a tener problemas de navegación y no aprender la tarea. El modelo de laberinto radial de Buresová et al. (1985), también presenta problemas debido a la gran automatización del aparato que es necesaria. Tomando en cuenta los antecedentes mencionados, es necesario contar con un laberinto que combine las bondades de laberintos acuáticos, pero que no necesiten de una demanda cognitiva que no pueda ser alcanzada por los animales. El laberinto acuático en “Y” se ha utilizado en trabajos de isquemia cerebral, donde se encontró que funciona como un modelo adecuado para medir el aprendizaje espacial (Hernández-Aguilar, 2013), sin embargo, no se han hecho estudios con otro tipo de condiciones experimentales ni para medir memoria.

2.10. Pruebas conductuales asociadas a ansiedad

La ansiedad es un proceso básico de supervivencia que emerge en situaciones estresantes, prepara al organismo para el escape o la lucha. No obstante, si el estadio de ansiedad es demasiado prolongado o exagerado, produce conductas

maladaptativos, como el miedo excesivo a situaciones u objetos inofensivos, pobre concentración, rumiación, entre otras (Leuner & Shors, 2013). El miedo y la ansiedad son parte de un grupo de respuestas adaptativas hacia estímulos amenazantes (Davis, 2000). Existen diversos paradigmas experimentales que nos permiten conocer los niveles de ansiedad, esto gracias a la identificación de conductas específicas asociadas a ansiedad (Biedenkapp & Rudy, 2009) como: Laberinto en Cruz Elevado (Pellow et al., 1985), la prueba de Campo Abierto (Noemí Rueda et al., 2008), Enterramiento Defensivo y Conductas de Evasión Condicionada (Buccafusco, 2001).

El laberinto en cruz elevado, es un modelo clásico para medir ansiedad no condicionada (Pellow et al., 1985). El laberinto en cruz elevado está formado por dos brazos cerrados y dos brazos abiertos (Fig. 5). Debido a una tendencia natural, los roedores prefieren pasar más tiempo en lugares cerrados y oscuros, y presentan conductas de evasión a espacios abiertos o altos, acompañado de conductas de defecación y congelamiento (Pellow et al., 1985)..



Figura 5. Laberinto en cruz elevado (LEC). Está compuesto por 4 brazos: dos abiertos, dos cerrados, unidos por un cuadrado.

En el presente trabajo se administró el T-2 a ratones con el objetivo de conocer el efecto del consumo del T-2 en la habilidad de los ratones para resolver paradigmas conductuales asociados a memoria y ansiedad; y en el número de espinas dendríticas.

3. JUSTIFICACIÓN

El suministro adecuado de nutrientes es un factor clave para el buen funcionamiento y desarrollo del individuo (Benton, 2010a), especialmente, el cerebro es sensible a cambios en la alimentación, sobre todo durante las primeras fases del desarrollo (Benton, 2010b). Deficiencias en la dieta afectan el desarrollo de las neuronas y espinas dendríticas generando ciertos tipos de discapacidad intelectual (Díaz-Cintra et al., 1994), que mejoran con el consumo de dietas o nutrientes específicos (Morley, 2010). Por otro lado, se han utilizado intervenciones nutricionales en trastornos del desarrollo como el síndrome de Down y el autismo, teniendo resultados favorables (J. M. Ellis et al., 2008; Whiteley et al., 2012).

Estudios preliminares señalan que los pacientes con síndrome de Down que consumieron el T-2, tuvieron un mejor desarrollo psicomotor y calidad de sueño, así como reducción en la ansiedad. Sin embargo, su efecto sobre personas regulares, así como sobre otras conductas y los mecanismos involucrados en estos procesos son desconocidos. Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo establecer el efecto del consumo de T-2 en la eficiencia de ratones sin ninguna patología, para resolver paradigmas conductuales asociados a memoria y conductas asociadas a la ansiedad, como una probable analogía de lo que puede suceder en humanos regulares y tratar de dilucidar algunos de los posibles mecanismos celulares implicados en este proceso. Adicionalmente este trabajo buscó aportar evidencia experimental que valide o no el consumo del T-2 en la población en general y particularmente en personas con síndrome de Down.

4. OBJETIVO

4.1. *Objetivo general.*

Conocer el efecto del consumo del T-2 en ratones en la resolución de pruebas conductuales y si estos cambios se asocian a modificaciones en las espinas dendríticas.

4.2. *Objetivos específicos*

- a) Establecer si la ingesta del T-2 modifica el desempeño de los animales para resolver paradigmas experimentales asociados a memoria.
- b) Establecer si la ingesta del T-2 modifica el desempeño de los animales para resolver paradigmas experimentales asociados a ansiedad.
- c) Explorar si la ingesta de T-2 modifica la formación de espinas dendríticas.
- d) Determinar si existe una relación entre los cambios conductuales y cambios en las espinas dendríticas.

5. HIPÓTESIS

- La ingesta del T-2 mejora la eficiencia de los animales para resolver paradigmas experimentales asociados a memoria.
- El consumo oral del T-2 mejora el desempeño de los animales para resolver paradigmas experimentales asociados a ansiedad.
- La ingesta de T-2 incrementa el número de espinas dendríticas.
- Existe una relación entre el consumo oral del T-2 en la eficiencia de los ratones para resolver tareas conductuales y el incremento el número de espinas dendríticas.

6. MÉTODO

6.1. *Sujetos*

Se utilizaron ratones macho (n=31) de la cepa C57BL6/J, de 21 días posnatales procedentes de la Facultad de Psicología de la UNAM. Los ratones se mantuvieron a un temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, con un ciclo luz-oscuridad de 12-12 hr (7:00 -19:00 hr) y fueron alojados en cajas de policarbonato en grupos de tres. La manipulación y cuidado de los ratones siguieron las reglas establecidas en el Reglamento de la Ley General en Materia de ética experimental establecida en el Reglamento de la Ley General en Materia de Investigación para la Salud en México (NOM-062-ZOO-199, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales del laboratorio; Secretaría de Salud Pública, 1999).

6.1.1. *Consumo del T-2*

El T-2 fue preparado diariamente en 20 ml de agua a una dosis de 80 mg/ml.

6.1.2. *Determinaciones fisiológicas*

El peso de los ratones se midió con una balanza (Ohaus), la talla de los ratones se cuantifico de la nariz del ratón a la base de la cola con un calibrador de precisión manual (Vernier), Estas mediciones se realizaron una vez por semana durante los sesenta días de experimentación para observar posibles cambios debido al consumo del T-2.

6.1.3. Grupos experimentales

En el día 1 experimental, se dividió a los animales en un grupo control (n=16) que consumió agua dos veces al día (7:00 y 18:30 hrs) durante 30 min y un grupo T-2 (n=15) que fue expuesto al T-2 dos veces al día (7:00 y 18:30 hrs) durante 30 min, siendo el T-2 el único líquido al que tuvieron acceso. El consumo de agua y T-2 se obtuvo diariamente restando el volumen no consumido del volumen inicial.

Con el fin de aislar los efectos de las diferentes condiciones experimentales, el grupo control y T-2 fueron divididos de la siguiente manera.

1. Administración de agua (Control n=2) o T-2 (T-2 n=2) durante 30 días
2. Administración de agua (Control n=2) o T-2 (T-2 n=2) durante 60 días sin manipulación conductual.
3. Administración de agua (Control n=5) o T-2 (T-2 n=4) durante 60 días sometidos a la tarea reconocimiento de objetos novedosos, prueba asociada a la memoria de reconocimiento.
4. Administración de agua (Control n=5) o T-2 (T-2 n=5) durante 60 días sometidos al laberinto acuático en "Y", prueba asociada a la memoria espacial.
5. Administración de agua (Control n=2) o T-2 (T-2 n=2) durante 60 días sometidos al laberinto en cruz elevado, prueba asociada a ansiedad.

Todas las pruebas conductuales fueron registradas con una video cámara SAMSUNG (Mod. HMX-F80) y los análisis conductuales analizados off-line.

Durante los sesenta días que duraron los experimentos el alimento sólido se restringió a 10 g por sujeto experimental. El consumo de alimento se cuantificó todos los días, pesando la cantidad de pellet consumido durante el día anterior.

Después de treinta y sesenta días de experimentación los cerebros de los ratones se extrajeron y procesaron para tinción rápida de Golgi (ver más adelante)

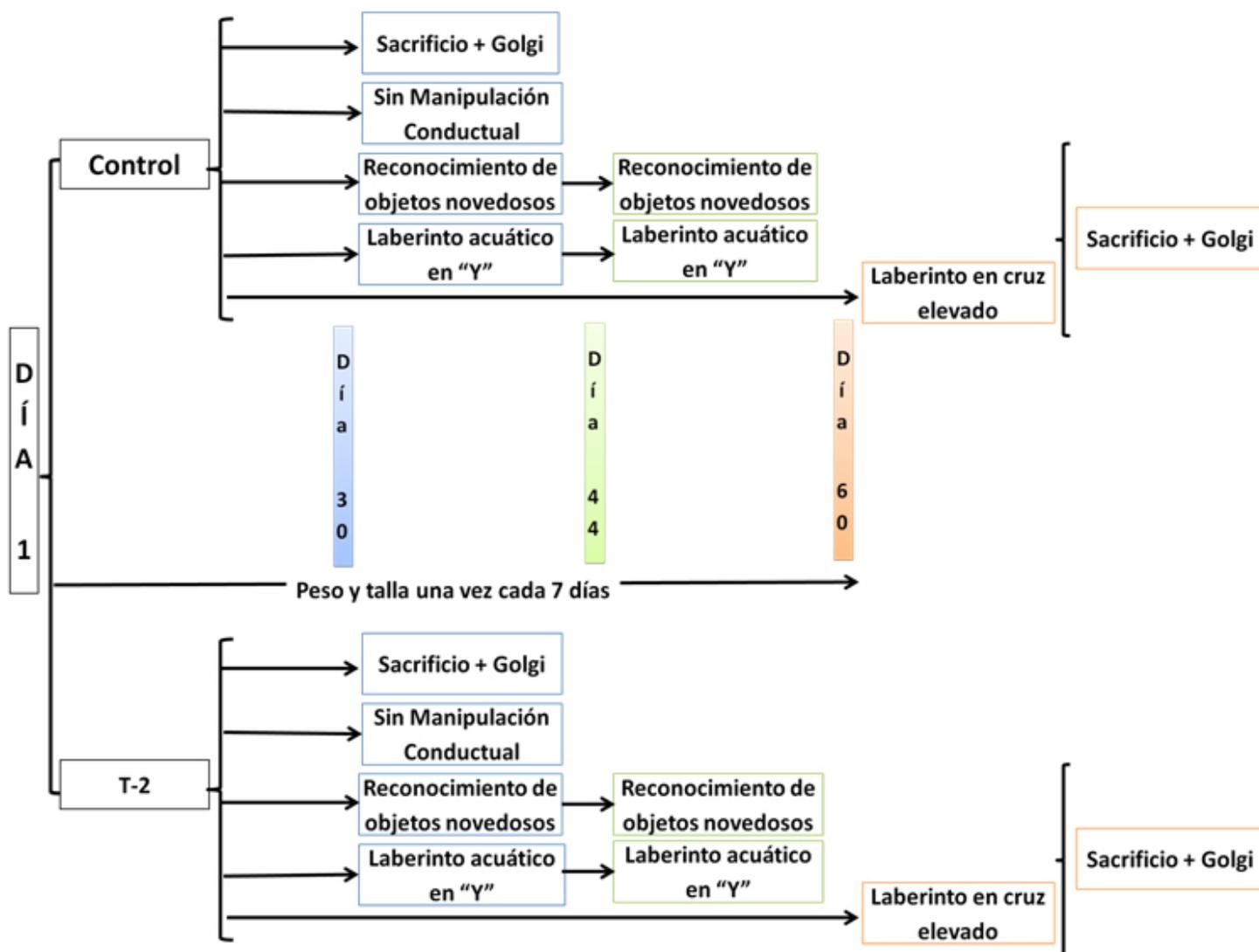


Figura 6. Diseño experimental utilizado en esta tesis. Se muestra el tiempo en el cual se realizaron las manipulaciones experimentales.

6.2. Análisis conductual

6.2.1. Reconocimiento de objetos novedosos

La tarea de reconocimiento de objetos novedosos se utilizó para medir el aprendizaje y la memoria de reconocimiento de corto plazo (Fernandez & Garner, 2008). El protocolo para esta tarea se basó en el propuesto por Myskiw et al.(2008), con breves modificaciones propuestas por Morice et al. (2008). Concluidos 30 días de ingesta del T-2, los ratones de los grupos control y T-2 fueron sometidos a dos ensayos de este paradigma conductual, con intervalos de 7 días entre ensayo. Se utilizó un campo abierto como base para la tarea reconocimiento de objetos novedosos. El campo consistió en una caja de policarbonato (40x40x30 cm), con paredes oscurecidas (Fig. 7) y diversos objetos de madera y plástico no porosos, con diferentes formas y patrones de colores, pero con tamaño similar entre ellos. Cada ensayo consistió en 3 fases: habituación, entrenamiento y prueba.

- **Habituación**

Los ratones fueron habituados en el campo abierto durante 10 minutos por tres días, en esta fase no existió ningún objeto. Concluidos los 10 minutos, el campo abierto se limpió con alcohol al 70% para retirar cualquier pista olfativa.

- **Entrenamiento**

Durante la fase de entrenamiento se colocaron 2 objetos idénticos (objetos familiares) (Fig. 7A), que fueron fijados en el campo abierto. Los ratones podían explorar estos objetos durante 10 minutos. Después de este tiempo los objetos y el

campo abierto fueron limpiados como se describió previamente. Cada ensayo tuvo un grupo de objetos distintos colocados en una ubicación distinta.

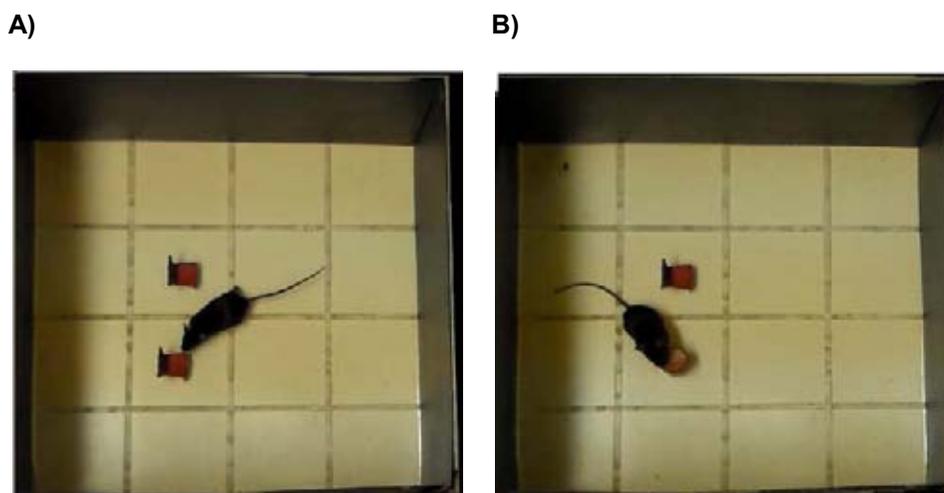


Figura 7. Reconocimiento de objetos novedosos. **A)** Fase de entrenamiento. Se muestra el campo abierto, mientras un ratón explora los objetos idénticos (familiares). **B)** Fase de Prueba. Se muestra el campo abierto con un objeto familiar y un objeto novedoso. Después de 10 minutos, pasado el entrenamiento, se permitió que el ratón explorara durante 10 minutos esta nueva composición de objetos.

- Prueba

Se permitió a los ratones descansar de la fase de entrenamiento durante 10 minutos, después de los cuales los roedores se colocaron nuevamente en el campo abierto. Durante esta fase se conservó uno de los objetos familiares y se colocó un objeto novedoso (Fig. 7B). Se permitió que el animal explorara durante 10 minutos los objetos. La capacidad de reconocer un objeto novedoso fue determinada a través del índice de discriminación, la medida operacional de memoria de reconocimiento a corto plazo. El índice de discriminación (Fernandez & Garner, 2008) es definido como:

$$\frac{(\text{Tiempo de exploración del objeto novedoso}) - (\text{Tiempo de exploración del objeto familiar})}{\text{Tiempo total de exploración}} \times 100$$

6.2.2. Laberinto Acuático en “Y”

Aún cuando existen diversos trabajos de utilización de laberintos terrestre en “Y” para la medición de memoria espacial (Ma, Chen, He, Zeng, & Wang, 2007; Pioli et al., 2013; Ross, Bartness, Mielke & Parent, 2009), solo se ha reportado un trabajo con laberinto acuático en “Y” (Hernandez-Aguilar, 2013). El laberinto acuático en “Y” requiere de un menor esfuerzo motor (Hernandez-Aguilar, 2013), facilitando la resolución de la tarea para evaluar la memoria espacial (Fig. 8). El laberinto consta de una estructura de policarbonato blanco de tres brazos de 8X30X17 cm, con un ángulo de 120° entre cada brazo (estructura basada en Zhang, 2008). Brevemente después de 30 días del consumo del T-2 los ratones del grupo control y T-2, fueron expuestos a 2 ensayos de laberinto acuático en “Y”, con intervalos de 7 días entre cada ensayo. La tarea consistió en dos fases: entrenamiento y recuperación.



Figura 8. Laberinto acuático en “Y”. Compuesto por 3 brazos, cada uno con un ángulo de 120° de separación, cada brazo mide 8X30 X17.

- Entrenamiento

En esta fase el aparato fue cubierto con agua a temperatura ambiente, opacada con leche en polvo (Nido). En el brazo derecho se colocó una plataforma de escape

cubierta por 2 cm de agua. Se permitió al ratón nadar libremente hasta encontrar la plataforma durante 60 s, si no era encontrada se dirigió al animal a ella y se mantuvo sobre esta durante 15 s (Morris, 1984). Esta fase consistió en 2 ensayos durante seis días consecutivos. Se cuantificó la latencia de llegada a la plataforma, durante los seis días de entrenamiento.

- Prueba

En la fase de prueba se conservaron todas las especificaciones del aparato, temperatura y coloración del agua; pero se eliminó la plataforma de escape. El ratón solo tuvo 1 ensayo y se contabilizó el porcentaje de tiempo que permaneció en el brazo donde se encontraba la plataforma (brazo correcto), como indicador de evocación de memoria espacial.

6.2.3. Laberinto en cruz elevado

La tarea de laberinto en cruz elevado, se empleó para medir conductas asociadas a ansiedad, con el protocolo estándar de la tarea propuesto por Pellow (1985). Para ello se utilizó un laberinto en cruz elevado que consiste en 4 brazos (dos brazos abiertos de color blanco, dos brazos cerrados de color negro, con paredes de 15 cm de alto), con 30 cm de largo por 5 cm de ancho, los brazos están unidos por un cuadro central de 5X5 cm; la distancia entre el piso y los brazos fue de 40 cm (Fig. 9).

Para la realización del laberinto en cruz elevado, se expuso a los animales una sola vez al laberinto. Se colocó a los animales en el cuadro central, permitiendo que

exploraran el laberinto por 5 minutos, pasados los cuales se regresaron a su caja habitación. Se midieron los siguientes indicadores de ansiedad: tiempo de permanencia en cada uno de los brazos y frecuencia de asomar la cabeza en el brazo abierto. Se consideró que el animal entraba al brazo después de dar 4 pasos dentro del brazo (línea roja en Fig. 9) Se realizó la prueba durante el día 60 experimental.



Figura 9. Laberinto en cruz elevado. Esta compuesto por 4 brazos, cada uno tiene un ángulo de 90° de separación, cada brazo mide 5X30 X15.

6.5 Análisis histológico

6.5.1 Tinción rápida de Golgi

Después de 60 días de administración del T-2, los ratones del grupo control y T-2, fueron sacrificados bajo anestesia profunda y perfundidos transcárdialmente con 150 ml de solución salina al 0.9% para drenar la sangre de los tejidos seguido por una solución de paraformaldehído (PFA) (Sigma-Aldrich) al 4% en buffer de fosfatos (PBS) (0.1 M, pH de 7.4). Los cerebros se extrajeron y fijaron por tres horas adicionales con PFA al 4% (4°C).

Al término del periodo de post-fijación, los cerebros se sumergieron en una solución de osmio (Tetraóxido de osmio 0.3%) (Electron Microscopy Science) y

dicromato de potasio al 3% (Electron Microscopy Science) durante 7 días. Posteriormente, se lavaron los cerebros 2 veces con agua desionizada y se sumergieron por 24 hrs en una solución de nitrato de plata al 0.75% (Electron Microscopy Science). Los cerebros fueron encastrados en parafina y cortados en rebanadas de 90 μm de grosor con un micrótopo (American Optical Company). Las rebanadas fueron deshidratadas en alcohol al 96° (J.T.Baker), seguido por dos lavados con alcohol absoluto (J.T.Baker), 10 minutos por cada lavado y sumergidas en esencia de clavo concentrado para clarear el tejido por 10 minutos. Inmediatamente los cerebros fueron lavados con xilol (J.T.Baker), durante 10 minutos. Finalmente los cortes se montaron en portaobjetos cubiertos con resina Entellan (Merk Millipore International).

6.5.2 Análisis de espinas dendríticas

Para el análisis de espinas fueron capturadas al menos 5 neuronas piramidales de la región CA1 en el hipocampo dorsal por animal, con una cámara C-MEX de 5.0 pixeles (Euromex), conectada a un microscopio óptico (US Micro Optic Solutions), estas fotografías se utilizaron para el análisis cuantitativo, el cual fue realizado con el programa Image Focus (Euromex). Solo las neuronas que mostraron una impregnación completa del árbol dendrítico y que estaban relativamente aisladas de las neuronas vecinas se seleccionaron para el análisis, se cuantificó el número de espinas dendríticas en 10 μm de largo, a partir de 10-15 μm de la bifurcación en las dendritas secundarias.

Adicionalmente fueron hechos dibujos ilustrativos de las diferentes condiciones experimentales a través de una cámara lucida (Olympus). Los dibujos fueron obtenidos con una lente de 100X de inmersión, ampliados y coloreados. Los dibujos representan segmentos mayores a los utilizados para el análisis estadístico.

6.6 Análisis estadístico

Una prueba de análisis de poder fue realizada previamente para calcular el tamaño mínimo de la muestra y detectar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales, evitando el uso excesivo de animales. Los datos obtenidos de los diferentes parámetros registrados fueron analizados con una prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnof. La mayoría de los datos obtenidos presentaron una distribución normal.

Para las mediciones de consumo de líquido, consumo de alimento sólido, peso y talla de los ratones se utilizó una prueba ANOVA de dos vías para medidas repetidas con un poshoc de Bonferroni.

En cuanto a las pruebas conductuales, los datos obtenidos en la prueba de reconocimiento de objetos novedosos se analizaron con una prueba t de Student. Por su parte, los datos de latencia a la plataforma obtenidos en el laberinto acuático en “Y” no cumplieron con el supuesto de igualdad de varianza, por lo que se analizaron con una prueba ANOVA de dos vías para medidas repetidas con un poshoc para varianzas no iguales T3 de Dunnet; adicionalmente, los datos obtenidos en la fase de

recuperación del laberinto acuático en “Y” no presentaron una distribución normal, para su análisis se utilizó un prueba U de Mann Withney. Así mismo, se analizaron los datos obtenidos en el laberinto en cruz elevado con una prueba t de Student.

Finalmente, se analizaron los datos histológicos por condición experimental con una prueba t de Student. Además se realizó una prueba “ANOVA” de una vía, con poshoc de Tukey, para hacer una comparación de las diferentes condiciones de los grupos en el análisis de tinción de Golgi.

Los datos se presentan como la media \pm el error estándar, la significancia estadística de los análisis fue considerada con una $p \leq 0.05$.

1. RESULTADOS

7.1. Cambios alimenticios

7.1.1. El consumo del T-2 produce un aumento en el consumo de líquido

Con el fin de conocer el efecto del consumo de T-2 en los patrones de ingesta de líquido, el volumen (ml) de agua o T-2 del grupo control y T-2, se contabilizó dos veces al día, durante los sesenta días de experimentación. Existió un efecto significativo del tiempo ($F(8,160)=1.864$, $p \leq 0.05$) y del grupo al que pertenecían ($F(1,20)=13.35$, $p \leq 0.05$). No existió una interacción significativa entre el tiempo y el grupo al que pertenecían. En el análisis *posthoc* se observó que a partir de la semana 4 hasta el final del tratamiento, el grupo T-2 consumió una mayor cantidad de líquido: semana 4 ($t=2.891$, $gl=180$, $p \leq 0.05$), semana 5 ($t= 3.041$, $gl=180$, $p \leq 0.05$), semana 6 ($t= 3.294$, $gl=180$, $p \leq 0.05$), semana 7 ($t= 3.152$, $gl=180$, $p \leq 0.05$), semana 8 ($t= 3.178$, $gl=180$, $p \leq 0.05$) y semana 9 ($t=2.958$, $gl=180$, $p \leq 0.05$) (Fig. 10). Estos resultados sugieren que los ratones que consumen el T-2 modifican su ingesta de líquido, lo cual podría deberse al sabor palatable del T-2.

Líquido (ml)

Figura 10. El consumo de T-2 modifica la ingesta de líquido. El consumo de T-2 fue medido dos veces al día durante toda la fase experimental. La gráfica muestra el promedio del consumo de líquido por semana \pm error estándar. Los ratones del grupo control son representados por círculos abiertos, mientras el grupo T-2 con cuadrados sólidos. Una prueba ANOVA de dos vías para medidas repetidas fue utilizada para conocer si existían diferencias entre los grupos.

7.1.2. El consumo del T-2 produce una disminución en el consumo de alimento sólido

Para conocer si el consumo del T-2 modificó los patrones de conducta de ingesta, se contabilizó la cantidad de alimento sólido (pellet), que consumieron los ratones de los dos grupos durante toda la fase experimental. Las mediciones de pellet (g) se realizaron diariamente por las mañanas. El análisis de las mediciones arrojó un efecto significativo del tiempo ($F(8,160)=4.165, p \leq 0.05$) y del grupo al que pertenecían los animales ($F(1,20)=6.802, p \leq 0.05$). Existió una interacción significativa entre el factor tiempo y grupo ($F(20,160)=4.924, p \leq 0.05$). El análisis *poshoc* mostró que durante las semana 2 y 3, el grupo T-2 disminuyó su consumo de pellet semana 2 ($t=4.822, gl=180, p \leq 0.05$), semana 3 ($t= 3.393, gl=180, p \leq 0.05$). Sin embargo a partir de la semana 4 no se observó ninguna diferencia significativa en la ingesta de pellet (Fig. 11). Estos resultados sugieren que el consumo de T-2 durante las primeras semanas sacia rápidamente a los ratones y por tanto disminuyen el consumo de pellet.

Pellet (g)

Figura 11. El T-2 disminuye el consumo de pellet. Los cambios en el consumo de Pellet fueron observados durante dos meses de tratamiento. Los ratones del grupo control son representados por círculos abiertos, mientras que el grupo T-2 con cuadrados sólidos. La gráfica muestra el promedio del consumo por semana \pm error estándar. Los datos se analizaron con una prueba ANOVA de dos vías para medidas repetidas.

7.2. Variables Fisiológicas

7.2.1. El consumo del T-2 produce un incremento en el peso de los ratones

Para conocer el efecto del consumo de T-2 en el peso (g) de los ratones, fue medido con una balanza digital una vez por semana durante sesenta días. El análisis estadístico muestra un efecto significativo del tiempo ($F(8,160)=166.8$, $p \leq 0.05$) y del grupo ($F(1,20)=17.99$, $p \leq 0.05$). No existió una interacción significativa entre el tiempo y el grupo al que pertenecían. A partir del análisis *posthoc* se comprobó que los animales del grupo T-2 incrementaron su peso desde la semana 4 hasta la semana 6 y esta tendencia se recupera en las últimas dos semanas de experimentación (Fig. 12): semana 4 ($t=3.200$, $gl=180$, $p \leq 0.05$), semana 5 ($t= 3.420$, $gl=180$, $p \leq 0.05$), semana 6 ($t= 3.426$, $gl=180$, $p \leq 0.05$), semana 8 ($t= 3.788$, $gl=180$, $p \leq 0.05$) y semana 9 ($t= 2.934$, $gl=180$, $p \leq 0.05$). Estos resultados muestran que el incremento de peso de los ratones que consumieron el T-2 se presenta en un periodo muy temprano de la intervención dietética y se mantiene constante en el tiempo (Fig. 12).

Peso (g)

Figura 12. El consumo del T-2 incrementa el peso en los ratones. El peso de los ratones fue comparado entre los grupos control y T-2 con una prueba ANOVA de dos vías para medidas repetidas. Los ratones del grupo control son representados por círculos abiertos, mientras el grupo T-2 con cuadrados sólidos. La gráfica muestra el promedio del peso por semana \pm error estándar.

7.2.2. El consumo de T-2 produce cambios en la talla de los ratones

Para conocer si el consumo del T-2 produce cambios en la talla (cm) de los ratones, el grupo control y T-2 fue medido semanalmente desde la nariz hasta la base de la cola con un calibrador. El análisis estadístico mostró un efecto significativo del tiempo ($F(8,160)=156.9$, $p \leq 0.05$) y del grupo al que pertenecían ($F(1,20)=15.18$, $p \leq 0.05$). No existió una interacción significativa entre el tiempo y el grupo al que pertenecían. Los resultados de la prueba *poshoc* mostraron que durante la semana 2 y 3 los ratones que consumieron el T-2 tuvieron una mayor longitud (Fig. 13): semana 2 ($t=3.383$, $gl=180$, $p \leq 0.05$) y semana 3 ($t=3.089$, $gl=180$, $p \leq 0.05$). Estos resultados sugieren que el consumo del T-2 produce un aumento inicial en la talla de los organismos, sin embargo, este efecto no es constante en el tiempo.

Talla(cm)

Figura 13. El consumo del T-2 incrementa la talla en los ratones. Después de 2 meses de tratamiento se comparo el tamaño de los ratones entre los grupo control y T-2 con una prueba ANOVA de dos vías para medidas repetidas. Los ratones del grupo control son representados por círculos abiertos, mientras el grupo T-2 con cuadrados sólidos. La gráfica muestra el promedio de la talla por semana \pm error estándar.

7.3. Efectos conductuales

7.3.1. El consumo de T-2 no produce cambios en la prueba de reconocimiento de objetos novedosos

Con el propósito de conocer el efecto del T-2 en la memoria de reconocimiento a corto plazo, los ratones del grupo control y T-2 fueron sometidos a la tarea de reconocimiento de objetos novedosos durante la semana de experimentación 4 (día 30 experimental). Los resultados muestran que los roedores del grupo T-2 tienen un mayor índice de discriminación en la tarea de reconocimiento de objetos novedosos; sin embargo, este incremento no es estadísticamente significativo. El incremento en el índice de discriminación se ve reducido durante la semana 6 (día 44 experimental) y no difiere significativamente de la media de índice de discriminación del grupo control (Fig. 14). Estos resultados sugieren que el consumo del T-2 no produce una mejor ejecución en tareas de evocación de la memoria de reconocimiento.

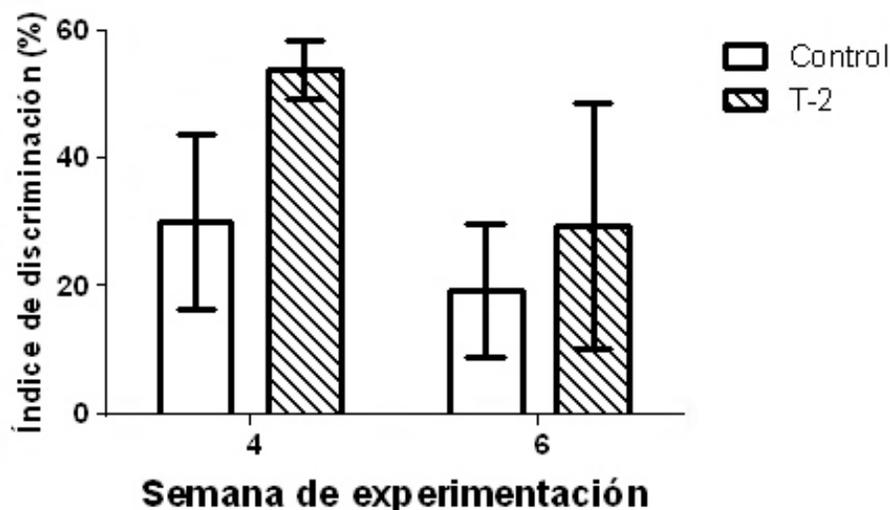


Figura 14. El consumo de T-2 no produce cambios en la memoria de reconocimiento. Fue obtenido el índice de discriminación en la tarea reconocimiento de objetos novedosos durante la semana 4 y 6. Las barras blancas representan a los ratones control y las barras rayas al grupo T-2. Se realizó una prueba “t de Student” para muestras independientes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas. La gráfica muestra el promedio de índice de discriminación \pm error estándar.

7.3.2. El consumo del T-2 no produce cambios en la ejecución de una tarea de memoria espacial

A efecto de determinar si el consumo de T-2 mejoraba la habilidad de los ratones para adquirir información espacial, los ratones fueron sometidos al laberinto acuático en “Y”. La latencia de llegada a la plataforma de escape (seg) fue analizada con una ANOVA de dos vías para medidas repetidas con un ajuste de grados de libertad de Huynh-Feldt, donde se observó un efecto significativo del tiempo ($F(2.967,16)=1.864, p \leq 0.05$), pero no en el grupo al que pertenecían, ni en la interacción entre los factores tiempo y grupo al que pertenecían. El *poshoc* para varianzas no

iguales T3 de Dunnet no mostró diferencias entre los grupos control y T-2, durante los dos ensayos en la semana 4 (día 30) (Fig. 15 **A**) y semana 6 de experimentación (día 44) (Fig. 15 **B**).

Figura 15. Latencia a la plataforma en el laberinto acuático en “Y”. Se grafica el promedio de latencia de llegada a la plataforma \pm error estándar. Los ratones fueron entrenados durante 6 días, con 2 ensayos por día durante la semana 4 (**A**) y 6 (**B**), del consumo del T-2. Los datos se analizaron ANOVA de dos vías con un ajuste de grados de libertad de Huynh-Feldt. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Para poder evaluar la evocación de la memoria antes adquirida, después de 6 días de entrenamiento en la semana 4 y semana 6 de experimentación, se retiró la plataforma de escape y se contabilizó el tiempo que pasaban los roedores en el brazo donde se encontraba la plataforma (brazo correcto). Los resultados muestran que los ratones pertenecientes al grupo T-2 no tuvieron un cambio significativo en la evocación de la memoria con respecto al grupo control (Fig. 16). Estos resultados indican que la tarea es fácilmente recordada. Además sugieren que el consumo del T-2 no tiene ningún efecto sobre el aprendizaje y la memoria espacial, la cual podría estar relacionada a un procesamiento hipocámpal.

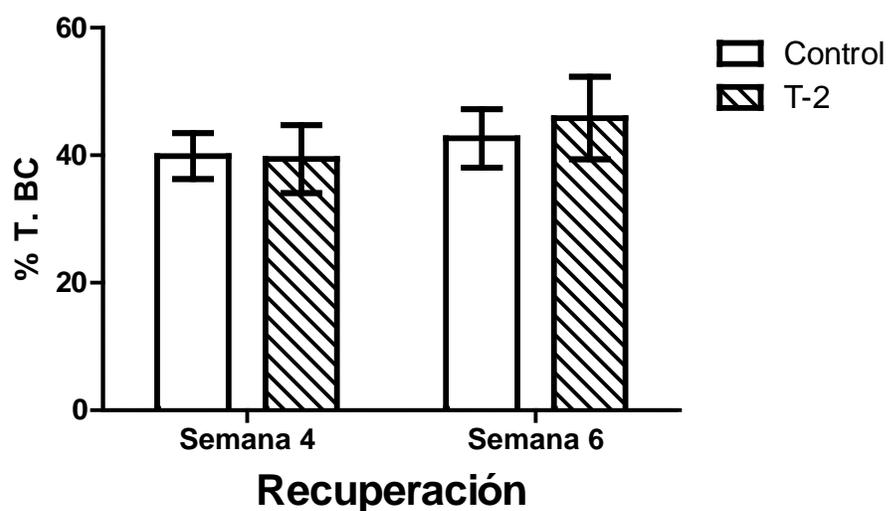


Figura 16. Porcentaje de tiempo en el brazo correcto. Se grafica el promedio del porcentaje de tiempo que pasan los ratones en el brazo correcto (BC) \pm error estándar. Durante la fase de prueba se cuantificó el porcentaje de tiempo que los ratones pasaban en el brazo donde se encontraba la plataforma. Las barras blancas representan a los ratones control y las barras rayas al grupo T-2. Los datos obtenidos fueron analizados por una prueba t de Student de muestras independientes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

7.3.3. Efecto del consumo del T-2 en las conductas asociadas a ansiedad

En estudios preliminares en personas con síndrome de Down se ha observado que el consumo del T-2 puede reducir los niveles de ansiedad. Con el fin de conocer el efecto del consumo de T-2 en los roedores sobre este tipo de conducta, se realizó un estudio exploratorio con la prueba de laberinto en cruz elevado. Los ratones fueron sometidos al laberinto en cruz elevado durante 5 min., se contabilizó el tiempo que pasaban en los brazos abiertos y cerrados, y el número de veces que asomaban la cabeza en el brazo abierto. Los ratones que consumieron el T-2 pasan una mayor proporción de tiempo en los brazos abiertos (Fig. 17 A) y tienen una mayor frecuencia de asomar la cabeza en los mismos (Fig. 17 B), que puede considerarse como una tendencia de menor ansiedad, no obstante las diferencias no son estadísticamente significativas.

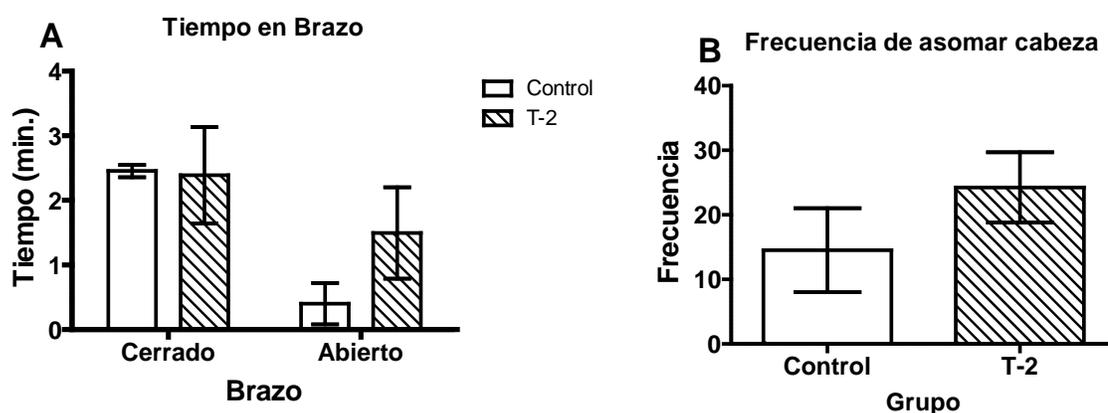


Figura 17. Laberinto en cruz elevado. Después de 6 semanas de consumo del T-2, los ratones fueron puestos en un laberinto en cruz elevado por 5 min. El tiempo que permanecieron en los brazos abiertos (**A**) y la frecuencia con la que los ratones asomaban la cabeza en los brazos abiertos (**B**) fue cuantificado. Las barras blancas representan a los ratones control y las barras rayas al grupo T-2. Los datos fueron analizados con una prueba “t de Student”. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

7.4. El consumo de T-2 incrementa el número de espinas dendríticas en el hipocampo.

En la actividad conductual se han observado cambios asociados a la conectividad neuronal (Anderson et al., 2007), adicionalmente una buena nutrición favorece la formación de las espinas dendríticas (Cintra et al., 1990). Con el fin de determinar si las mejoras observadas en las pruebas conductuales estaban asociadas a un incremento de espinas dendríticas, se realizó un estudio a través, de la tinción de Golgi.

Después de un mes de consumo de T-2 los ratones no mostraron diferencias notables en el número de espinas dendríticas con respecto al grupo control (Fig. 18A). Un análisis cuantitativo demostró que el numero de espines es el mismo (Fig. 18B).

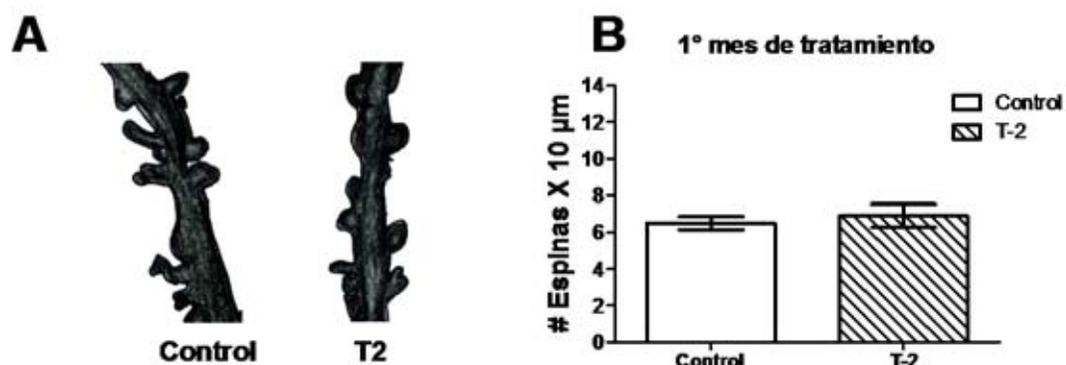


Figura 18. El consumo de T-2 no modifica la densidad de las espinas después de 1 mes de tratamiento. La figura muestra dibujos obtenidos con cámara lucida de la región CA1 (**A**). Los datos representan el promedio \pm error estándar en 10 μm de dendrita (**B**). Las barras blancas representan a los ratones control y las barras rayas al grupo T-2. Las medias fueron analizadas con una prueba "t de Student". No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

7.4.1. *El consumo de T-2 incrementa la densidad de sinapsis después de dos meses de consumo*

Después de dos meses de consumo de T-2 los ratones muestran un incremento en la densidad de espinas (Fig. 19A). Un análisis cuantitativo demostró que la densidad de espinas aumentó 28.9% con respecto al grupo control ($t = -3.34$, $gl = 52.95$, $p \leq 0.05$) (Fig. 19B). Este resultado indica que el T-2 puede favorecer la formación de espinas dendríticas.

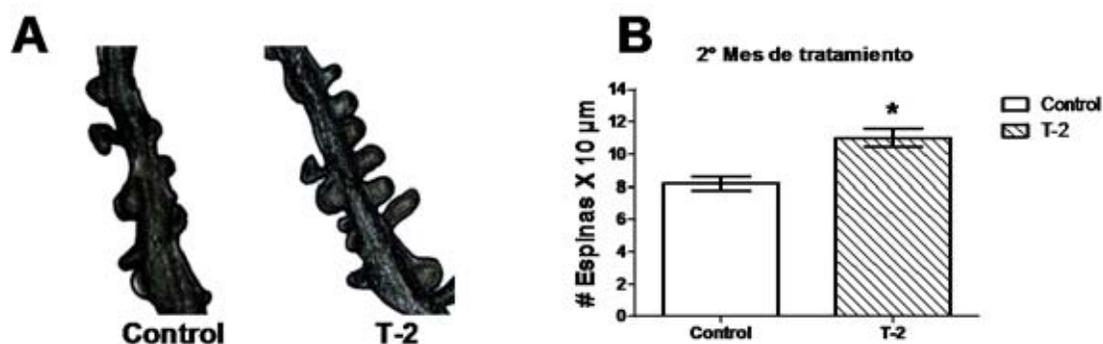


Figura 19. El consumo de T-2 produce un aumento de la densidad de las espinas después de 2 meses de tratamiento. En A se muestran dibujos obtenidos con cámara lucida de la región CA1 en un animal control (izquierda) y en un animal que consumió T-2 (derecha). La gráfica representa el promedio del número de espinas \pm error estándar en 10 μm de dendrita (B). Las medias fueron analizadas con una prueba "t de Student". * $p \leq 0.05$.

En una serie de experimentos independientes se trató de explorar si los ratones que consumieron el T-2 durante 2 meses y que fueron sometidos a la prueba reconocimiento de objetos novedosos mostraban un incremento adicional en el número de espinas. Los resultados demuestran que los ratones que consumieron T-2 presenta un aumento del 95.1% con respecto al grupo control ($t = -4.67$, $gl = 16.27$, $p \leq 0.05$) (Fig. 20). Sugiriendo que la mejora que se observa en la ejecución de la tarea reconocimiento de objetos novedosos, podría estar asociada a un aumento en el número de espinas.

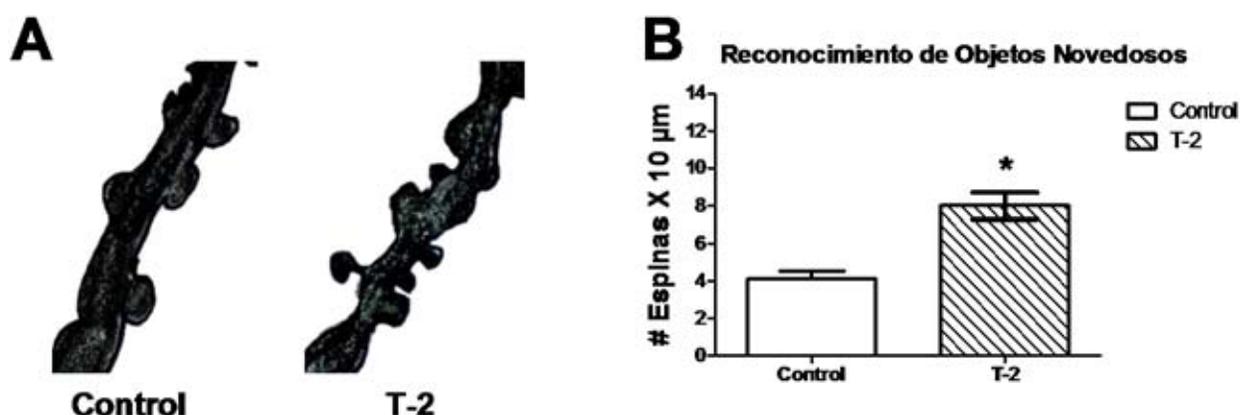


Figura 20. Efecto de T-2 en animales expuestos a reconocimiento de objetos novedosos. La figura muestra dibujos obtenidos con cámara lucida de la región CA1 (A) en un grupo control (izquierda) y en un grupo T-2 (derecha), sometidos. La gráfica representa el promedio de número de espinas \pm error estándar en 10 μ m de dendrita (B). Se conservan las acotaciones antes mencionadas. Las medias fueron analizadas con una prueba "t de Student". * $p \leq 0.05$.

Sin embargo, los animales que consumieron el T-2 y fueron sometidos al laberinto acuático en “Y” no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el número de espinas dendríticas con respecto al grupo control (Fig. 21).

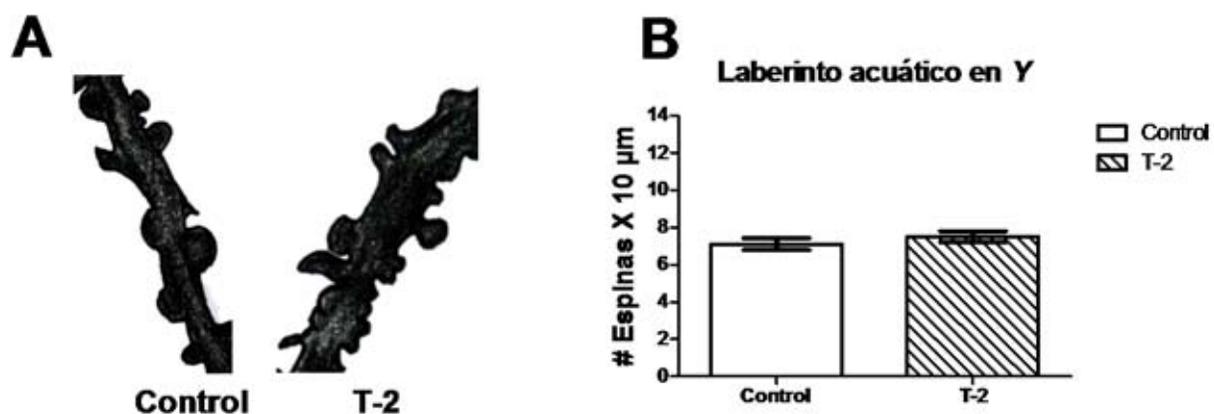


Figura 21. Efecto de T-2 en animales expuestos al laberinto acuático en “Y”. La figura muestra dibujos obtenidos con cámara lucida de la región CA1 (**A**) en un grupo control (derecha) y en un grupo T-2 (izquierda), sometidos en dos ocasiones al laberinto acuático en “Y”. La gráfica representa el promedio de número de espinas \pm error estándar en 10 μm de dendrita (**B**). Se conservan las acotaciones antes mencionadas. Las medias fueron analizadas con una prueba “t de Student”. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Un análisis de “ANOVA” de una vía para comparar las diferentes condiciones experimentales encontró que existieron diferencias en las medias de las espinas dendríticas en las distintas condiciones experimentales ($F(3,86)=10.79$, $p \leq 0.05$), el análisis *poshoc* mostró que durante el segundo mes de tratamiento, los ratones del grupo T-2 que no fueron manipulados conductualmente (SMC) tenían un número de

espinas significativamente mayor que aquellos ratones del grupo T-2 sometidos a la tarea de reconocimiento de objetos novedoso (NOR) ($q= 4.127$, $gl= 86$, $p\leq 0.05$) y los sometidos al laberinto acuático en “Y” (LAY) ($q= 6.923$, $gl= 86$, $p\leq 0.05$) (Fig. 24); es decir, el solo consumo del complemento aumenta el número de espinas. Con este último análisis se sugiere que el consumo del T-2 podría aumentar el número de espinas y hacer más eficiente la conectividad de la neurona.

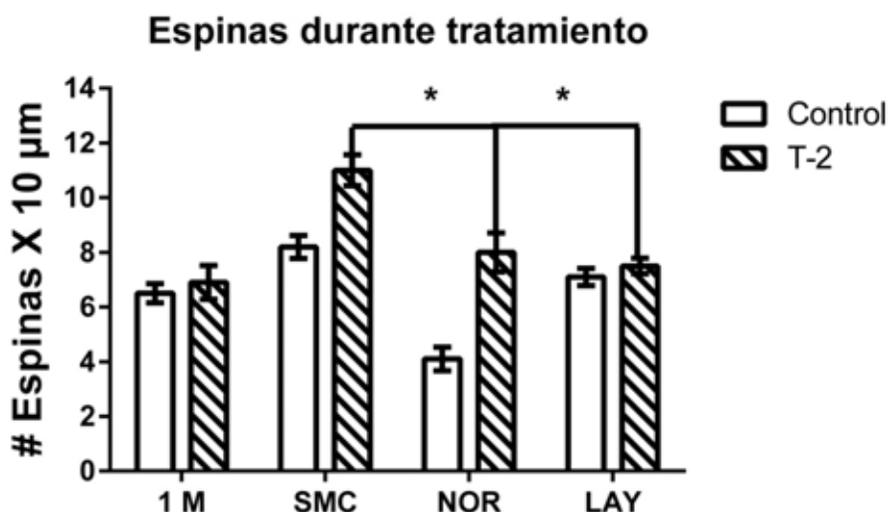


Figura 22. Espinas durante el tratamiento. La gráfica representa el promedio de número de espinas \pm error estándar en 10 μm de dendrita por cada condición experimental: 1 mes de experimentación (1 M), sin manipulación conductual (SMC), reconocimiento de objetos novedosos (NOR) y laberinto acuático en “Y” (LAY). Se conservan las acotaciones antes mencionadas. Las medias fueron analizadas con una prueba “ANOVA” de una vía con un *poshoc* de Tukey.

8. DISCUSIÓN

Diversas investigaciones han reportado la importancia de las dietas y sus componentes nutricionales para mejorar diversos procesos cognitivos en la enfermedad de Alzheimer (Stackman et al., 2003), en el autismo (Whiteley et al., 2012) y en el síndrome de Down (Jovanovic, Clements, & MacLeod, 1998), sugiriendo un papel importante de la alimentación para contrarrestar alteraciones en el sistema nervioso central. El objetivo de la presente investigación fue conocer el efecto del T-2 sobre la resolución de pruebas conductuales y si estos cambios se asocian a modificaciones en las espinas dendríticas. La ingesta del T-2 produjo un incremento en el consumo de alimento sólido y de ingesta de líquido. Por otro lado incremento el peso y talla de los ratones, que puede relacionarse con el incremento de la ingesta de calorías contenidas en el T-2. En la resolución de las pruebas conductuales el consumo de T-2, no produjo cambios estadísticamente significativos en la resolución de pruebas asociadas a la memoria y a la ansiedad. Por otra parte, la ingesta de T-2 incrementó el número de espinas dendríticas basales secundarias en la región CA1 del hipocampo dorsal, después de haber sido consumido durante treinta y sesenta días, sin que existiera una manipulación conductual; cuando se presentaba una manipulación conductual, el número de espinas dendríticas del grupo T-2 era similar al del grupo control.

8.1. El consumo de T-2 modifica patrones de ingesta.

Durante la semana de tratamiento 2 y 3, los ratones del grupo T-2 consumieron una menor cantidad de pellet comparados al grupo control, este aumento puede tratarse de un mecanismo compensatorio por la alta ingesta calórica que aporta el T-2 y que no se consume en alimento sólido. Durante las semanas restantes, la ingesta de pellet se regulariza y es similar a la que presentan los controles, resultado de un efecto de tolerancia a la dosis de carbohidratos presentes en el complemento. La fructuosa contenida en el CT-2 podría contribuir a la regularización del consumo de pellet, debido a que la ingesta de fructuosa no produce el mismo grado de saciedad que normalmente ocurre con un alimento calórico similar que contiene glucosa (Nicole M Avena, Rada, & Hoebel, 2008); este aumento de peso también se ha reportado en población humana con este tipo de dietas (Song et al., 2012). El efecto de tolerancia a los alimentos dulces se presenta en pacientes con sobrepeso, los cuales reportan un gran deseo por consumir alimentos dulces (Avena, Rada, Moise, & Hoebel, 2006). A diferencia de la ingesta de pellet, la ingesta de líquidos es significativamente mayor en el grupo T-2 a partir de la semana de tratamiento 4, explicable por la gran palatabilidad y aporte calórico del complemento. Resultados similares se han observado en la ingesta de otro tipo de complementos saborizados como el "Ensure", en donde se ha observado la preferencia que tienen los animales a alimentos dulces (Téllez, Pérez, Simon, & Gutiérrez, 2012).

8.2. El consumo de T-2 tiene un efecto en variables fisiológicas.

Los resultados muestran que los ratones que consumen el T-2 tienen un aumento estadísticamente significativo del peso durante las semanas de experimentación 4 a 6 y 8 a 9. El incremento en el peso es explicable por el gran volumen consumido de T-2, el cual aporta una gran cantidad de calorías a través de la fructuosa contenida en los fructo-oligosacaridos y la inulina. En experimentos con roedores, se ha reportado que el consumo de dietas altas en fructuosa, aumentan el peso y son un factor importante en el desarrollo de la obesidad (Elliot, 2002). Este aumento de peso debido a una dieta hipercalórica, también se ha reportado en población humana (Song et al., 2012). Este dato no debe perderse de vista al considerar la viabilidad de administrar el T-2 a pacientes con síndrome de Down, ya que el aumento de peso es uno de los problemas más frecuentes en esta población; por lo cual una dieta alta en carbohidratos podría contribuir a la ganancia de peso, de hecho, en este tipo de pacientes, se recomienda una restricción calórica para prevenir obesidad, así como promover la pérdida de peso para minimizar la tasa metabólica (Roizen, 2002). Aunado al aumento de peso, existe un incremento en la talla durante las semanas 2-3, que puede corresponder a una compensación del sistema en respuesta al aumento de peso; sin embargo, no hay investigaciones que reporten el efecto de una dieta hipercalórica con respecto al cambio de talla.

Por otro lado, es importante contar con otro tipo de herramientas experimentales para conocer a fondo los efectos del complemento, como es la utilización de cajas metabólicas que permitan conocer la excreción de orina y poder medir concentraciones

de azúcar, además de contar con pruebas de resistencia a la insulina, pruebas de daño hepático y medición de grasa corporal.

8.3. El efecto del T-2 en la memoria de reconocimiento y espacial.

De acuerdo a los datos obtenidos, el consumo de T-2 no produce mejorías estadísticamente significativas en la memoria de reconocimiento. En experimento similares con ratas, a las que se administran grandes cantidades de sacarosa y son sometidas a la prueba de reconocimiento de objetos novedosos, se observa un porcentaje de exploración igualitario entre el objeto novedoso y el familiar; este tipo de dieta inflama el hipocampo y aumenta los niveles de estrés oxidativo lo que daña la formación de la memoria de reconocimiento, (Beilharz, Maniam, & Morris, 2014), efecto que podría estarse observando en la presente investigación. Los efectos de dietas hipercalóricas pueden ser más robustos, en la obesidad inducida por glucosa en ratas jóvenes, se reporta un menor tiempo de exploración del objeto novedoso, el cual se correlaciona negativamente con los niveles de glucosa en sangre, en la curva dosis respuesta se observa un peor desempeño de la tarea de reconocimiento de objetos novedosos conforme se aumentan los niveles de glucosa en plasma, que pueden deberse a un incremento en la actividad locomotora y a factores inflamatorios en el hipocampo (Jurdak & Kanarek, 2009).

Los bajos índices de discriminación observados en el grupo T-2, también podrían relacionarse con una hiperactividad del sistema por la ingesta de grandes volúmenes de T-2. Popularmente se ha asociado la ingesta de azúcar a un aumento en la actividad

locomotora, sin embargo los estudios no son concluyentes (White & Wolraich, 1995), en un meta análisis realizado por Wolraich (1995), se reporta que no existe una relación entre el consumo de azúcar y el incremento de la actividad locomotora. En ratones, por su parte, se ha observado que la cepa C57BL6, cepa utilizada en el presente trabajo, es muy sensible a las dietas altas en carbohidratos, aumentando rápidamente el número de adipocitos y mayor actividad locomotora (Brownlow, Petro, Feinglos, & Surwit, 1996); por su parte, Kendig (2014) reporta que al hacer comparativos de diversos estudios, los resultados tampoco son concluyentes, sin embargo la ingesta de azúcar induce disfunciones cognitivas, sobre todo en tareas de aprendizaje y memoria espacial.

Por otro lado, los índices de discriminación bajos en el grupo control y T-2 durante la semana 6, pueden deberse a un factor de habituación a la prueba. De acuerdo con Antunes & Biala (2012), el tiempo de exploración, así como el índice de discriminación en la prueba de reconocimiento de objetos novedosos; en ocasiones puede ser bajo o incoherente, lo cual se observa desde la primera exposición y no necesariamente refleja un problema en la memoria de reconocimiento. Por último, parece existir una tendencia a mejorar los índices de discriminación durante la semana de experimentación 4, que debe ser comprobada con experimentos subsecuentes que cuenten con una n experimental más grande, y otro tipo de pruebas asociadas a la memoria de reconocimiento.

De igual forma, en el laberinto acuático en “Y”, que está asociado con la memoria espacial, no existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y T-2, en este laberinto no se presentaron cambios en el tiempo de adquisición

ni en la evocación de la memoria. Este tipo de laberinto acuático solo ha sido utilizado anteriormente en un trabajo (Hernandez-Aguilar, 2013). Hernández- Aguilar, reporta que animales isquémicos, no presentan diferencias en el tiempo de adquisición comparado con ratones íntegros, lo cual concuerda con los resultado obtenidos en el presente trabajo; no obstante en dicha investigación no se evalúa la evocación de la memoria, por lo que no se cuenta con parámetros de referencia para esta parte de la prueba. En otro tipo de laberinto acuático, como el laberinto de agua de Morris, se ha reportado que dietas altas en grasa y azúcar refinada, provocan una mayor latencia de llegada a la plataforma de escape, a causa de disminuir las cantidades del RNA mensajero que codifica BDNF en el hipocampo (Molteni, Barnard, Ying, Roberts & Gómez-Pinilla, 2002). También se ha demostrados que dietas al 60 % de fructuosa por 19 semanas, incrementan el tiempo de latencia de llegada a la plataforma y un menor tiempo de acercamiento a la zona donde se encontraba la plataforma (Beilharz et al., 2014). En la presente investigación no se presentaron estos daños en la consolidación y evocación de la memoria espacial.

Aun cuando no se obtuvieron diferencias entre los grupo, el laberinto acuático en “Y” demostró ser un modelo conductual eficaz para medir memoria espacial, debido a que los animales rápidamente reducen su latencia de llegada a la plataforma, por lo que es fácilmente aprendido y evocado. No obstante, durante la fase de recuperación se observan porcentajes de tiempo pequeños (por abajo del 50%), lo cual podría ser indicativo de la necesidad de contar con parámetros más finos durante el proceso de recuperación en esta prueba, como es la contabilización de errores y la latencia de llegada al sitio donde se encontraba la plataforma.

Para poder conocer ampliamente los efectos del T-2, es necesario contar con otras herramientas conductuales. Para lo cual, es conveniente realizar una evaluación del perfil neurofarmacológico como la propuesta por Irwin, (1962) en donde se pueda evaluar, a través método observacional los diversos efectos del T-2 en diferentes dosis y periodos de tiempo.

8.4. El efecto del T-2 en la ansiedad

El consumo de T-2 en ratones no reduce las conductas asociadas a ansiedad evaluadas en el laberinto en cruz elevado, sin embargo el grupo evaluado presento una gran variabilidad al ser una n experimental pequeña, por lo que podría existir una tendencia de disminución de este tipo de conductas cuando se evalúe grupos más grandes. A diferencia de lo obtenido en este trabajo, la disminución de las conductas de ansiedad ha sido reportada en el consumo de dietas a base de miel (Chepulis, Starkey, Waas, & Molan, 2009), así como cuando son administrados extractos de origen vegetal con efectos similares a los observados por una dosis estándar de BZD (Chatterjee et al., 2013). Por otro lado, cambios en los componentes de la dieta también disminuyen conductas asociadas a la ansiedad. Este fenómeno se ha observado, en dietas altas en triptófano (Zeisel, 1986). Nakamura et al., (2010) reportó que la ingesta de caseína hidrosilasa, derivada de la leche bovina, aumenta la actividad parasimpática y reduce los niveles de ansiedad.

Los pacientes con síndrome de Down exhiben trastornos afectivos, por ejemplo existen conductas asociadas a hiperactividad y niveles basales de ansiedad alterados (Pueschel, 1992), estas características también se han observado en ratones

parcialmente trisómicos, Ts65Dn, (de la Torre & Dierssen, 2012; Escorihuela et al., 1995). Por otro lado, en pacientes con síndrome de Down se ha observado que el bajo metabolismo de glucosa correlaciona con una deficiente respuesta de los pacientes a pruebas neuropsicológicas de habilidad visoespacial, lenguaje y memoria (Schapiro et al., 1988). En cambio, la ingesta de glucosa en pacientes con síndrome de Down mejora la ejecución de pruebas de memoria a largo plazo y procesamiento auditivo, que puede deberse a una activación global del sistema, y no a un efecto específico en el sistema nervioso central (Manning, Honn, Stone, Jane, & Gold, 1998). En trabajos realizados por nuestro laboratorio, las personas con síndrome de Down que durante seis meses consumen el T-2 aunado con una dieta libre de gluten y caseína, incrementan los niveles de metabolitos de serotonina, los cuales se encontraban en niveles bajos previos al tratamiento (García, et al, en preparación), estos cambios podrían estar asociados a la sensación de bienestar y disminución de ansiedad reportada subjetivamente por los cuidadores.

El posible efecto ansiolítico producido por el T-2 podría estar asociado a una mejor eficiencia en la síntesis de neurotransmisores particularmente la serotonina, aumentando la acción inhibitoria que ejerce la serotonina en regiones responsables de la ansiedad como es la corteza orbitofrontal (Jufe, 2006). Adicionalmente la ingesta de Omega 3, contenido en el T-2 a través de la linaza, reduce en un 20% los niveles de ansiedad en humanos (Kiecolt-Glaser, Belury, Andridge, Malarkey, & Glaser, 2011), sugiriendo que los componentes del T-2 pueden disminuir conductas asociadas a la ansiedad.

No obstante, es importante recordar que el laberinto en cruz elevado es utilizado para medir el control de la actividad locomotora (Holsboer & Ströler, 2005); por lo que es conveniente considerar la utilización de otro tipo de pruebas que permitan disgregar factores de hiperactividad y de conductas relacionadas a la ansiedad, como el rotarod y el campo abierto. En modelos parcialmente trisómicos como el Ts65Dn se ha reportado un aumento de motricidad durante la realización del laberinto en cruz elevado (Chen, Y.; Mao, Y.; Zhou, D.; Hu, X.; Wang, 2010), ello se ha relacionado con la falta de atención a estímulos, propio del SD, ya que se presenta mayor actividad en el campo abierto (Martínez-Cué et al., 2005). Cabe destacar que existen compuestos orgánicos, como la *Stachys lavandulifolia Vahl*, que tienen un efecto ansiolítico pero no aumentan la motricidad durante la exposición al laberinto en cruz elevado (Rabbani, Sajjadi, & Zarei, 2003).

8.5. El consumo de T-2 tiene efectos diferenciales en la formación de espinas dendríticas.

Junto con el análisis conductual se realizó un análisis histológico a través de la tinción de Golgi, con el objetivo de determinar el efecto del T-2 en la formación de espinas dendríticas; particularmente en el hipocampo dorsal, el cual está considerablemente vinculado con la codificación de la información espacial (Antunes & Biala, 2012). De acuerdo a los resultados obtenidos el consumo de T-2 produce un incremento en el número de espinas dendríticas después de dos meses de tratamiento aún cuando los animales no recibieron ningún estímulo adicional al complemento.

El hipocampo y las espinas dendríticas son componentes altamente sensibles a la dieta, ya que un desbalance en la cantidad de nutrientes ingerida, como en la desnutrición, impacta en la densidad y morfología de espinas dendríticas (Benítez-Bribiesca, De la Rosa-Alvarez, & Mansilla-Olivares, 1999; Brock & Prasad, 1992; Díaz-Cintra, García-Ruiz, Corkidi, & Cintra, 1994).

Al ser las espinas el principal contacto de las sinapsis excitatorias, contienen la maquinaria celular necesaria para la síntesis de neurotransmisores y la producción de energía. Adicionalmente, la despolarización repetida produce una redistribución de las espinas dentro de las dendritas que es dependiente de energía (Li, Okamoto, Hayashi, & Sheng, 2004). Un incremento de metabolitos primarios y la elevación en las reservas de energía podría estimular la actividad mitocondrial y producir un aumento en la densidad de espinas dendríticas (Killeen, Russell, & Sergeant, 2013).

En pacientes con síndrome de Down se ha reportado una actividad mitocondrial adaptativa a la baja, que junto con la reducida secreción de insulina ayuda a tener una mejor eficiencia de actividad energética, contribuyendo a la homeostasis (Helguera et al., 2013). En cambio una respuesta mitocondrial a la alta también da como respuesta grandes cantidades de estrés oxidativo (Jovanovic et al., 1998), de hecho el restablecimiento metabólico y por tanto de las espinas dendríticas, aumenta los niveles de estrés oxidativo y el daño celular (Helguera et al., 2013).

Nuestros resultados muestran que el número de espinas después de uno y dos meses de tratamiento, es mayor que el observado cuando se estimula conductualmente a través de tareas de aprendizaje y memoria, aún cuando se ha reportado que el aprendizaje de tareas espaciales produce un aumento en el número

de espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo (Moser, Trommald, & Andersen, 1994; Segal & Andersen, 2000); por lo que no se observó un efecto sinérgico del T-2 con la conducta. Esta discrepancia podría deberse a un refinamiento del circuito a través de la eliminación en el número de espinas producto del aprendizaje (Aziz et al., 2014; Bourne & Harris, 2007). La eliminación de espinas dendríticas también conocida como *pruning*, se ha considerado un proceso que se presenta solo durante el desarrollo; sin embargo, se reportó que la activación repetida de receptores NMDA durante los procesos de aprendizaje promueve la eliminación de sinapsis, eliminando aquellas que no son funcionales (Bock & Braun, 1999). Adicionalmente, se ha observado que aunque el aprendizaje aumenta el número de espinas dendríticas en un primer momento, conforme se consolida la memoria a largo plazo, el número de espinas se reduce (Aziz et al., 2014). Particularmente en el grupo control y T-2, que fueron sometidos al laberinto acuático en “Y”, se observó un decremento en el número de espinas dendríticas, que podrían atribuirse al mecanismo antes mencionado. Por otro lado podría deberse a la temperatura del agua, ya que cambios en la temperatura aumentan la respuesta de estrés y alteran los niveles de corticoesterona (Szuran, Pliška, Pokorny, & Welzl, 2000), los niveles altos de estrés durante largos periodos de tiempo disminuyen el número de espinas dendríticas (Leuner & Shors, 2013).

Otros autores sugieren que un número de espinas elevado no necesariamente implicaría un cambio plástico favorable para el individuo (Fiala, Spacek, & Harris, 2002), lo cual podría elucidar porque no existió una mejor ejecución en la tarea de reconocimiento de objetos novedosos. Un ejemplo claro es el caso del autismo, donde al analizar en tejido cerebral humano se ha reportado que existe un gran número de

espinas dendríticas en regiones pequeñas y focalizadas provocando circuitos reverberantes, sobre todo en regiones corticales, pero en regiones cerebrales alejadas se reporta un decremento de las espinas, por lo que en el autismo existe una hiperconectividad local, que podría ser responsable de conductas repetitivas, además ofrece una explicación a la alta incidencia de epilepsia en estos pacientes (Penzes, Cahill, Jones, VanLeeuwen, & Woolfrey, 2011).

Además del análisis de espinas dendríticas, es necesario conocer la funcionalidad de las mismas, que puede observarse a través de inmunofluorecencias. También, es preciso tener marcadores celulares que nos permitan elucidar si el T-2 altera el metabolismo celular, lo cual aumenta los niveles de estrés oxidativo.

8.6. El T-2 y su interacción con la microbiota intestinal.

En los estudios piloto realizados por nuestro grupo de investigación se ha observado una mejoría en aspectos cognitivos y reducción en la ansiedad, así como un mejor ciclo de sueño en los pacientes con síndrome de Down que consumen el T-2. Los efectos observados en los pacientes pueden ser explicados debido a que muchos de los compuestos contenidos en el T-2 ayudan al incremento de la microbiota intestinal. Los cambios en la microbiota intestinal favorecen el crecimiento de bacterias benéficas que mejoran la absorción intestinal. Recientemente se ha demostrado que la microbiota intestinal puede modular conductas asociadas a la ansiedad (Hsiao et al., 2013) y pueden aumentar la concentración de serotonina (Clarke et al., 2013) sugiriendo una interacción bidireccional entre el intestino y el cerebro (Milena-Marques, T.; Cryan, J.F.; Shanahan, F.; Fitzgerald, G. F. and Ross, 2013). Experimentos en

progreso son dirigidos a conocer si el T-2 produce cambios en la microbiota intestinal en ratones.

Con la información compilada se puede concluir que ratones que consumieron T-2 durante dos meses tienen un aumento de peso significativo desde etapas muy tempranas de la intervención, al igual que presentan un aumento de la talla, que puede deberse al importante consumo de T-2 que contiene una alta cantidad de azúcares. Además esta gran cantidad de azúcares, podría ser la responsable de los cambios en los patrones de ingesta de líquido por su sabor palatable y la compensación en el consumo de alimento sólido. Asimismo, el CT-2 no produce cambios en pruebas asociadas a memoria y ansiedad. Por otra parte, el T-2 produce efectos diferenciados a lo largo del tiempo en las espinas dendríticas, las cuales se ven aumentadas importantemente cuando el T-2 es administrado durante dos meses sin la presencia de ningún otro estímulo. Cabe destacar que el T-2 podría no solo estar aumentando los niveles de energía disponible, sino además mejorar la calidad de la microbiota intestinal y algunos de sus efectos podrían ser causados por este fenómeno.

Es importante señalar que el presente estudio fue un acercamiento exploratorio, cuya importancia reside en tener un panorama general de los posibles efectos del T-2; no obstante, parte de las limitaciones fue contar con una “n” pequeña, que causa una gran variabilidad de los datos. Por otro lado los resultados fueron obtenidos en una cepa de ratón sin ninguna alteración genética, por lo cual se hipotetiza que en modelos como el Ts65Dn los efectos del CT-2 llegarían a tener otro tipo de alcances. A sí mismo es necesario contar con ensayos clínicos controlados y sensibles a las necesidades de los pacientes.

9. CONCLUSIONES

La ingesta de T-2 produce cambios en los patrones del consumo de alimento sólido durante las primeras semanas de tratamiento, así como un aumento del consumo de líquido desde la tercera semana de tratamiento hasta el final del experimento.

La ingesta de T-2 produce un aumento de peso en ratones C57BL/6 a partir de la segunda semana de tratamiento.

La ingesta de T-2 produce un aumento de talla durante las primeras dos semanas de tratamiento.

La ingesta de T-2 durante dos meses no modifica la ejecución de la tarea de memoria de reconocimiento

La ingesta de T-2 no tiene un efecto en la memoria espacial.

El consumo de T-2 no reduce las conductas asociadas a ansiedad.

El consumo de T-2 aumenta el número de espinas dendríticas en el hipocampo después de dos meses de tratamiento comparado con los ratones controles, aun cuando estos eran sometidos a una prueba conductual.

8. REFERENCIAS

- Abudula, R., Jeppesen, P. B., Rolfsen, S. E. D., Xiao, J., & Hermansen, K. (2004). Rebaudioside A potently stimulates insulin secretion from isolated mouse islets: studies on the dose-, glucose-, and calcium-dependency. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 53(10), 1378–1381. doi:10.1016/j.metabol.2004.04.014
- Altman, J., Das, G. D., & Sudarshan, K. (1970). The influence of nutrition on neural and behavioral development. I. Critical review of some data on the growth of the body and the brain following dietary deprivation during gestation and lactation. *Developmental Psychobiology*, 3(4), 281–301. doi:10.1002/dev.420030408
- Anderson, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. (2007). *The Hippocampus Book*. Oxford University Press (p. 872). Oxford University Press. doi:10.1093/acprof:oso/9780195100273.001.0001
- Andrade, J. P., Castanheira-Vale, A. J., Paz-Dias, P. G., Madeira, M. D., & Paula-Barbosa, M. M. (1996). The dendritic trees of neurons from the hippocampal formation of protein-deprived adult rats. A quantitative Golgi study. *Experimental Brain Research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation Cerebrale*, 109(3), 419–433. doi:10.1007/BF00229626
- Andrade, J. P., Lukoyanov, N. V., & Paula-Barbosa, M. M. (2002). Chronic food restriction is associated with subtle dendritic alterations in granule cells of the rat hippocampal formation. *Hippocampus*, 12(2), 149–64. doi:10.1002/hipo.1102
- Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2), 93–110. doi:10.1007/s10339-011-0430-z
- Arrighoni, E., Brouns, F., & Amadò, R. (2007). Human gut microbiota does not ferment erythritol. *British Journal of Nutrition*, 94(05), 643. doi:10.1079/BJN20051546
- Avena, N. M., Rada, P., & Hoebel, B. G. (2008). Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32(1), 20–39. doi:10.1016/j.neubiorev.2007.04.019
- Avena, N. M., Rada, P., Moise, N., & Hoebel, B. G. (2006). Sucrose sham feeding on a binge schedule releases accumbens dopamine repeatedly and eliminates the acetylcholine satiety response. *Neuroscience*, 139(3), 813–20. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.12.037
- Aziz, W., Wang, W., Kesaf, S., Mohamed, A. A., Fukazawa, Y., & Shigemoto, R. (2014). Distinct kinetics of synaptic structural plasticity, memory formation, and memory

- decay in massed and spaced learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1), E194–202.
doi:10.1073/pnas.1303317110
- Beilharz, J. E., Maniam, J., & Morris, M. J. (2014). Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 37, 134–41. doi:10.1016/j.bbi.2013.11.016
- Benavides-Piccione, R., Ballesteros-Yáñez, I., de Lagrán, M. M., Elston, G., Estivill, X., Fillat, C., ... Dierssen, M. (2004). On dendrites in Down syndrome and DS murine models: a spiny way to learn. *Progress in Neurobiology*, 74(2), 111–26.
doi:10.1016/j.pneurobio.2004.08.001
- Benítez-Bribiesca, L., De la Rosa-Alvarez, I., & Mansilla-Olivares, A. (1999). Dendritic spine pathology in infants with severe protein-calorie malnutrition. *Pediatrics*, 104(2), e21. doi:10.1542/peds.104.2.e21
- Benton, D. (2010a). Neurodevelopment and neurodegeneration: are there critical stages for nutritional intervention? *Nutrition Reviews*, 68 Suppl 1, S6–S10.
doi:10.1111/j.1753-4887.2010.00324.x
- Benton, D. (2010b). The influence of dietary status on the cognitive performance of children. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(4), 457–470.
doi:10.1002/mnfr.200900158
- Biedenkapp, J. C., & Rudy, J. W. (2009). Hippocampal and extrahippocampal systems compete for control of contextual fear: role of ventral subiculum and amygdala. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 16(1), 38–45.
doi:10.1101/lm.1099109
- Blanquet, P. R. (2000). Casein kinase 2 as a potentially important enzyme in the nervous system. *Progress in Neurobiology*, 60(3), 211–246. doi:10.1016/S0301-0082(99)00026-X
- Bock, J., & Braun, K. (1999). Blockade of N-methyl-D-aspartate receptor activation suppresses learning-induced synaptic elimination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(5), 2485–90.
- Bourne, J., & Harris, K. M. (2007). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Current Opinion in Neurobiology*, 17(3), 381–386.
doi:10.1016/j.conb.2007.04.009
- Brock, J. W., & Prasad, C. (1992). Alterations in dendritic spine density in the rat brain associated with protein malnutrition. *Developmental Brain Research*, 66(2), 266–269. doi:10.1016/0165-3806(92)90090-J

- Brownlow, B. S., Petro, A., Feinglos, M. N., & Surwit, R. S. (1996). The role of motor activity in diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *Physiology & Behavior*, *60*(1), 37–41. doi:10.1016/0031-9384(95)02210-4
- Buccafusco, J. J. (2001). *Methods of behavior analysis in neuroscience*. Washington, D.C.: CRC Press LLC.
- Buckley, F., & Sacks, B. (2007). Drug treatment improves memory in mice. *Down's Syndrome, Research and Practice : The Journal of the Sarah Duffen Centre / University of Portsmouth*, *12*(1), 20–21. doi:10.3104/updates.2037
- Buresová, O., Bures, J., Oitzl, M. S., & Zahálka, A. (1985). Radial maze in the water tank: an aversively motivated spatial working memory task. *Physiology & Behavior*, *34*(6), 1003–1005. doi:10.1016/0031-9384(85)90028-9
- Campbell, J. M., Bauer, L. L., Fahey, G. C., Hogarth, A. J. C. L., Wolf, B. W., & Hunter, D. E. (1997). Selected fructooligosaccharide (1-kestose, nystose, and 1 F - - Fructofuranosyl nystose) Composition of Foods and Feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 3076–3082. doi:10.1021/jf970087g
- Castellví, P. S., Llorens Jové, M. E., Vilardell, P. D., Cerén, C. V., Saco, M. J. E., Guasch, X. D., & Torrent, F. R. (2008). Anemia y enfermedad celiaca en una paciente con síndrome de Down. *Revista Médica Internacional Sobre El Síndrome de Down*, *12*(1), 8–11. doi:10.1016/S1138-2074(08)70016-2
- Chapleau, C. A., Calfa, G. D., Lane, M. C., Albertson, A. J., Larimore, J. L., Kudo, S., ... Pozzo-Miller, L. (2009). Dendritic spine pathologies in hippocampal pyramidal neurons from Rett syndrome brain and after expression of Rett-associated MECP2 mutations. *Neurobiology of Disease*, *35*(2), 219–33. doi:10.1016/j.nbd.2009.05.001
- Chatterjee, M., Verma, R., Lakshmi, V., Sengupta, S., Verma, A. K., Mahdi, A. A., & Palit, G. (2013). Anxiolytic effects of *Plumeria rubra* var. *acutifolia* (Poiret) L. flower extracts in the elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Asian Journal of Psychiatry*, *6*(2), 113–8. doi:10.1016/j.ajp.2012.09.005
- Chechlac, M., & Gleeson, J. G. (2003). Is mental retardation a defect of synapse structure and function? *Pediatric Neurology*, *29*(1), 11–17. doi:10.1016/S0887-8994(03)00152-8
- Chen, Y.; Mao, Y.; Zhou, D.; Hu, X.; Wang, J. . M. Y. (2010). Environmental enrichment and chronic restraint stress in ICR mice: Effects on prepulse inhibition of startle and Y-maze spatial recognition memory. *Behavioural Brain Research*, *212*, 49–55.
- Chepulis, L. M., Starkey, N. J., Waas, J. R., & Molan, P. C. (2009). The effects of long-term honey, sucrose or sugar-free diets on memory and anxiety in rats. *Physiology & Behavior*, *97*(3-4), 359–68. doi:10.1016/j.physbeh.2009.03.001

- Chiricolo, M., Musa, A. R., Monti, D., Zannoti, M., & Franceschi, C. (1993). Enhanced DNA repair in lymphocytes of Down syndrome patients: the influence of zinc nutritional supplementation. *Mutation Research/DNAging*, 295(3), 105–111. doi:10.1016/0921-8734(93)90012-R
- Cintra, L., Díaz-Cintra, S., Galván, A., Kemper, T., & Morgane, P. J. (1990). Effects of protein undernutrition on the dentate gyrus in rats of three age groups. *Brain Research*, 532(1-2), 271–277.
- Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R. D., Shanahan, F., ... Cryan, J. F. (2013). The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Molecular Psychiatry*, 18(6), 666–73. doi:10.1038/mp.2012.77
- Closa-Monasterolo, R., Gispert-Llaurado, M., Luque, V., Ferre, N., & Rubio-Torrents, C. (2013). Safety and efficacy of inulin and oligofructose supplementation in infant formula : Results from a randomized clinical trial. *Clinical Nutrition*, 32(6), 918–927. doi:10.1016/j.clnu.2013.02.009
- Comery, T. A., Harris, J. B., Willems, P. J., Oostra, B. A., Irwin, S. A., Weiler, I. J., & Greenough, W. T. (1997). Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(10), 5401–5404.
- Cramer, N., & Galdzicki, Z. (2012). From abnormal hippocampal synaptic plasticity in down syndrome mouse models to cognitive disability in down syndrome. *Neural Plasticity*, 2012, 101542. doi:10.1155/2012/101542
- Cruz-Martín, A., Crespo, M., & Portera-Cailliau, C. (2010). Delayed stabilization of dendritic spines in fragile X mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(23), 7793–7803.
- Davis, M. (2000). The role of the amygdala in conditioned and unconditioned fear and anxiety. In *The amygdala* (pp. 213–287). New York: Oxford University Press.
- De Bruin, J. P. C., Swinkels, W. A. M., & de Brabander, J. M. (1997). Response learning of rats in a Morris water maze: Involvement of the medial prefrontal cortex. *Behavioural Brain Research*, 85(1), 47–55. doi:10.1016/S0166-4328(96)00163-5
- De la Torre, R., & Dierssen, M. (2012). *Therapeutic approaches in the improvement of cognitive performance in Down syndrome: past, present, and future. Progress in brain research* (Vol. 197, pp. 1–14). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-444-54299-1.00001-7
- Den Hartog, G. J. M., Boots, A. W., Adam-Perrot, A., Brouns, F., Verkooijen, I. W. C. M., Weseler, A. R., ... Bast, A. (2010). Erythritol is a sweet antioxidant. *Nutrition*

- (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 26(4), 449–58.
doi:10.1016/j.nut.2009.05.004
- Díaz-Cintra, S., García-Ruiz, M., Corkidi, G., & Cintra, L. (1994). Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Research*, 662(1-2), 117–126. doi:10.1016/0006-8993(94)90803-6
- Dierssen, M., & Ramakers, G. J. a. (2006). Dendritic pathology in mental retardation: from molecular genetics to neurobiology. *Genes, Brain, and Behavior*, 5 Suppl 2(April 2005), 48–60. doi:10.1111/j.1601-183X.2006.00224.x
- Dobbing, J., & Smart, J. L. (1974). Vulnerability of developing brain and behaviour. *British Medical Bulletin*, 30, 164–168.
- Domjan, M. (2003). *Principios de Aprendizaje y Conducta* (Internatio.). Ciudad de México.
- Ellis, J. M., Tan, H. K., Gilbert, R. E., Muller, D. P. R., Henley, W., Moy, R., ... Logan, S. (2008). Supplementation with antioxidants and folic acid for children with Down's syndrome: randomised controlled trial. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 336(7644), 594–597.
- Ellis, N. R., Woodley-Zanthos, P., & Dulaney, C. L. (1989). Memory for spatial location in children, adults, and mentally retarded persons. *American Journal of Mental Retardation : AJMR*, 93(5), 521–526.
- Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behavioural Brain Research*, 215(2), 244–54.
doi:10.1016/j.bbr.2009.12.036
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31(1), 47–59.
doi:10.1016/0166-4328(88)90157-X
- Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., Vallina, I. F., Baamonde, C., Lumbreras, M. A., Dierssen, M., ... Flórez, J. (1995). A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. *Neuroscience Letters*, 199(2), 143–146.
doi:10.1016/0304-3940(95)12052-6
- Fernandez, F., & Garner, C. C. (2008). Episodic-like memory in Ts65Dn, a mouse model of Down syndrome. *Behavioural Brain Research*, 188(1), 233–237.
doi:10.1016/j.bbr.2007.09.015
- Ferrer, I., & Gullotta, F. (1990). Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus, 680–685.

- Fiala, J. C., Spacek, J., & Harris, K. M. (2002). Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Research. Brain Research Reviews*, 39(1), 29–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086707>
- Galaburda, A. M., Wang, P. P., Bellugi, U., & Rossen, M. Cytoarchitectonic anomalies in a genetically based disorder: Williams syndrome. , 5 *Neuroreport* 753–757 (1994). doi:10.1097/00001756-199403000-00004
- García-López, P., García-Marín, V., & Freire, M. (2007). The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience. *Progress in Neurobiology*, 83(2), 110–130. doi:10.1016/j.pneurobio.2007.06.002
- García-Ruiz, M., Díaz-Cintra, S., Cintra, L., & Corkidi, G. (1993). Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages. *Brain Research*, 625(2), 203–212. doi:10.1016/0006-8993(93)91060-6
- Gómez-Pinilla, F. (2010). Brain foods : the effects of nutrients on brain function. *Nature Review Neuroscience*, 9(7), 568–578. doi:10.1038/nrn2421.Brain
- Gregersen, S., Jeppesen, P. B., Holst, J. J., & Hermansen, K. (2004). *Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. Metabolism: clinical and experimental* (Vol. 53, pp. 73–76). doi:10.1016/j.metabol.2003.07.013
- Guedj, F., Sébrié, C., Rivals, I., Ledru, A., Paly, E., Bizot, J. C., ... Delabar, J. M. (2009). Green tea polyphenols rescue of brain defects induced by overexpression of DYRK1A. *PloS One*, 4(2), e4606. doi:10.1371/journal.pone.0004606
- Gundappa, G., & Desiraju, T. (1988). Deviations in brain development of F2 generation on caloric undernutrition and scope of their prevention by rehabilitation: alterations in dendritic spine production and pruning of pyramidal neurons of lower laminae of motor cortex and visual cortex. *Brain Research*, 456(2), 205–223. doi:10.1016/0006-8993(88)90220-X
- Helguera, P., Seiglie, J., Rodriguez, J., Hanna, M., Helguera, G., & Busciglio, J. (2013). Adaptive downregulation of mitochondrial function in down syndrome. *Cell Metabolism*, 17(1), 132–40. doi:10.1016/j.cmet.2012.12.005
- Hering, H., & Sheng, M. (2001). Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(12), 880–8. doi:10.1038/35104061
- Hernández-Aguilar, D. O. (2013). *Efecto del ambiente enriquecido en las alteraciones del aprendizaje y memoria inducida por isquemia cerebral aguda*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E. R., McCue, T., ... Mazmanian, S. K. (2013). Microbiota Modulate Behavioral and Physiological

- Abnormalities Associated with Neurodevelopmental Disorders. *Cell*, 155(7), 1451–1463. doi:10.1016/j.cell.2013.11.024
- Hyde, L. A., & Crnic, L. S. (2001). Age-related deficits in context discrimination learning in Ts65Dn mice that model Down syndrome and Alzheimer's disease. *Behavioral Neuroscience*, 115, 1239–1246.
- Hyde, L. A., Hoplight, B. J., & Denenberg, V. H. (1998). Water version of the radial-arm maze: learning in three inbred strains of mice. *Brain Research*, 785(2), 236–244. doi:10.1016/S0006-8993(97)01417-0
- Innis, S. M. (2008). Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain Research*, 1237, 35–43. doi:10.1016/j.brainres.2008.08.078
- Irwin, S. (1962). Drug screening and evaluative procedures. *Science*, 136, 123–128.
- Jarma O., A. de J., Combatt C., E. M., & Claves L., J. A. (2010). Aspectos nutricionales y metabolismo de Stevia rebaudiana (Bertoni). Una revisión . *Agronomía Colombiana*, 28, 199–208.
- Jeneson, A., & Squire, L. R. (2012). Working memory, long-term memory, and medial temporal lobe function. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 19(1), 15–25. doi:10.1101/lm.024018.111
- Jernigan, T. L., Bellugi, U., Sowell, E., Doherty, S., & Hesselink, J. R. (1993). Cerebral morphologic distinctions between Williams and Down syndromes. *Archives of Neurology*, 50(2), 186–191. doi:10.1001/archneur.1993.00540020062019
- Jovanovic, S. V, Clements, D., & MacLeod, K. (1998). Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome. *Free Radical Biology & Medicine*, 25(9), 1044–1048. doi:10.1016/S0891-5849(98)00137-3
- Jufe, G. (2006). *Psicofarmacología Práctica*. (Polemos.). Buenos Aires.
- Jurdak, N., & Kanarek, R. B. (2009). Sucrose-induced obesity impairs novel object recognition learning in young rats. *Physiology & Behavior*, 96(1), 1–5. doi:10.1016/j.physbeh.2008.07.023
- Kaufmann, W. E., & Moser, H. W. (2000). Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 10(10), 981–91.
- Kaur, N., & Gupta, A. K. (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*, 27(7), 703–714. doi:10.1007/BF02708379

- Kelly-Quagliana, K. A. A., Nelson, P. D. D., & Buddington, R. K. K. (2003). Dietary oligofructose and inulin modulate immune functions in mice. *Nutrition Research*, 23, 257–267.
- Kemper, T. L., Pasquier, D. A., & Drazen, S. (1978). Effect of a low protein diet on the anatomical development of subcortical formations. *Brain Research Bulletin*, 3(5), 443–450. doi:10.1016/0361-9230(78)90073-4
- Kendig, M. D. (2014). Cognitive and behavioural effects of sugar consumption in rodents. A review. *Appetite*, 80, 41–54. doi:10.1016/j.appet.2014.04.028
- Kesslak, J. P., Nagata, S. F., Lott, I., & Nalcioglu, O. (1994). Magnetic resonance imaging analysis of age-related changes in the brains of individuals with Down's syndrome. *Neurology*, 44(6), 1039–1045. doi:10.1212/WNL.44.6.1039
- Kiecolt-Glaser, J. K., Belury, M. A., Andridge, R., Malarkey, W. B., & Glaser, R. (2011). Omega-3 supplementation lowers inflammation and anxiety in medical students: a randomized controlled trial. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(8), 1725–34. doi:10.1016/j.bbi.2011.07.229
- Killeen, P. R., Russell, V. a, & Sergeant, J. a. (2013). A behavioral neuroenergetics theory of ADHD. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(4), 625–57. doi:10.1016/j.neubiorev.2013.02.011
- Leuner, B., & Shors, T. J. (2013). Review stress, anxiety and dendritic spines: What are the connections? *Neuroscience*, 251, 108–119.
- Li, Z., Okamoto, K.-I., Hayashi, Y., & Sheng, M. (2004). The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell*, 119(6), 873–87. doi:10.1016/j.cell.2004.11.003
- Li, Z., & Sheng, M. (2003). Some assembly required: the development of neuronal synapses. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(11), 833–41. doi:10.1038/nrm1242
- Lister, J. P., Blatt, G. J., DeBassio, W. A., Kemper, T. L., Tonkiss, J., Galler, J. R., & Rosene, D. L. (2005). Effect of prenatal protein malnutrition on numbers of neurons in the principal cell layers of the adult rat hippocampal formation. *Hippocampus*, 15(3), 393–403. doi:10.1002/hipo.20065
- Liu, J., Li, J., & Tang, J. (2010). Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts. *Food and Bioprocess Processing*. doi:10.1016/j.fbp.2009.12.005
- Lockrow, J., Prakasam, A., Huang, P., Bimonte-Nelson, H., Sambamurti, K., & Granholm, A.-C. (2009). Cholinergic degeneration and memory loss delayed by

- vitamin E in a Down syndrome mouse model. *Experimental Neurology*, 216(2), 278–289.
- Lögberg, B., & Brun, A. (1993). Prefrontal neocortical disturbances in mental retardation. *Journal of Intellectual Disability Research : JIDR*, 37 (Pt 5), 459–468.
- Lott, I. T., & Dierssen, M. (2010). Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with Down's syndrome. *Lancet Neurology*, 9(6), 623–33. doi:10.1016/S1474-4422(10)70112-5
- Ma, M. X., Chen, Y. M., He, J., Zeng, T., & Wang, J. H. (2007). Effects of morphine and its withdrawal on Y-maze spatial recognition memory in mice. *Neuroscience*, 147(4), 1059–65. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.05.020
- Malin, D. H., Lee, D. R., Goyarzu, P., Chang, Y.-H., Ennis, L. J., Beckett, E., ... Joseph, J. A. (2011). Short-term blueberry-enriched diet prevents and reverses object recognition memory loss in aging rats. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 27(3), 338–42. doi:10.1016/j.nut.2010.05.001
- Mangan, P. A. (1992). Spatial memory abilities and abnormal development of the hippocampal formation in Down syndrome. *Unpublished Doctoral Dissertation, University of Arizona, Tucson*. Retrieved from
- Manning, C. A., Honn, V. J., Stone, W. S., Jane, J. S., & Gold, P. E. (1998). Glucose effects on cognition in adults with Down's syndrome. *Neuropsychology*, 12(3), 479–484. doi:10.1037/0894-4105.12.3.479
- Marin-Padilla, M. (1976). Pyramidal cell abnormalities in the motor cortex of a child with Down's syndrome. A Golgi study. *The Journal of Comparative Neurology*, 167(1), 63–81. doi:10.1002/cne.901670105
- Martin, H. P. (1973). Nutrition: its relationship to children's physical, mental, and emotional development. *American Journal of Clinical Nutrition*, 766–775.
- Martínez-Cué, C., Rueda, N., García, E., Davisson, M. T., Schmidt, C., & Flórez, J. (2005). Behavioral, cognitive and biochemical responses to different environmental conditions in male Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Behavioural Brain Research*, 163(2), 174–185. doi:10.1016/j.bbr.2005.04.016
- McKevith, B. (2005). Nutritional aspects of oilseeds. *Nutrition Bulletin*, 30(1), 13–26. doi:10.1111/j.1467-3010.2005.00472.x
- Meng, Y., Zhang, Y., Tregoubov, V., Janus, C., Cruz, L., Jackson, M., ... Jia, Z. (2002). Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron*, 35(1), 121–133. doi:10.1016/S0896-6273(02)00758-4

- Milena-Marques, T.; Cryan, J.F.; Shanahan, F.; Fitzgerald, G. F. and Ross, R. P. (2013). Gut microbiota modulation and implications for host health: Dietary strategies to influence the gut–brain axis.
- Miyoshi, E., Wietzikoski, E. C., Bortolanza, M., Boschen, S. L., Canteras, N. S., Izquierdo, I., & Da Cunha, C. (2012). Both the dorsal hippocampus and the dorsolateral striatum are needed for rat navigation in the Morris water maze. *Behavioural Brain Research*, 226(1), 171–8. doi:10.1016/j.bbr.2011.09.011
- Moon, J., Chen, M., Gandhi, S. U., Strawderman, M., Levitsky, D. A., Maclean, K. N., & Strupp, B. J. (2010). Perinatal choline supplementation improves cognitive functioning and emotion regulation in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Behavioral Neuroscience*, 124(3), 346–361.
- Morgane, P. J., Austin-LaFrance, R., Bronzino, J., Tonkiss, J., Díaz-Cintra, S., Cintra, L., ... Galler, J. R. (1993). Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 17(1), 91–128. doi:10.1016/S0149-7634(05)80234-9
- Morice, E., Andrae, L. C., Cooke, S. F., Vanes, L., Fisher, E. M. C., Tybulewicz, V. L. J., & Bliss, T. V. P. (2008). Preservation of long-term memory and synaptic plasticity despite short-term impairments in the Tc1 mouse model of Down syndrome. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 15(7), 492–500.
- Morley, J. E. (2010). Nutrition and the brain. *Clinics in Geriatric Medicine*, 26(1), 89–98. doi:10.1016/j.cger.2009.11.005
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11(1), 47–60. doi:10.1016/0165-0270(84)90007-4
- Moser, M. B., Trommald, M., & Andersen, P. (1994). An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(26), 12673–12675. doi:10.1073/pnas.91.26.12673
- Mulloy, A., Lang, R., Reilly, M. O., Sigafos, J., Lancioni, G., & Rispoli, M. (2010). Research in Autism Spectrum Disorders Gluten-free and casein-free diets in the treatment of autism spectrum disorders : A systematic review. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 4(3), 328–339. doi:10.1016/j.rasd.2009.10.008
- Myskiw, J. C., Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R. M., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2008). On the participation of mTOR in recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(3), 338–351. doi:10.1016/j.nlm.2007.10.002

- Nakamura, H., Iwamoto, M., Washida, K., Sekine, K., Takase, M., Park, B.-J., ... Miyazaki, Y. (2010). Influences of casein hydrolysate ingestion on cerebral activity, autonomic nerve activity, and anxiety. *Journal of Physiological Anthropology*, *29*(3), 103–8.
- Nandy, S., Irving, M., Gordon, D., Subramanian, S. V., & Smith, G. D. (2005). Poverty, child undernutrition and morbidity: new evidence from India. *Bulletin of the World Health Organization*, *83*(3), 210–216.
- Nelson, A., Lebessi, A., Sowinski, P., & Hodges, H. (1997). Comparison of effects of global cerebral ischaemia on spatial learning in the standard and radial water maze: relationship of hippocampal damage to performance. *Behavioural Brain Research*, *85*(1), 93–115.
- Nicoll, R. A., & Schmitz, D. (2005). Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nature Reviews. Neuroscience*, *6*(11), 863–876. doi:10.1038/nrn1786
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-199, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales del laboratorio; Secretaría de Salud Pública. (1999).
- O'Brien, L. (2001). *Alternative Sweeteners* (Third Edit.). United States of America: Marcel Dekker.
- O'Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map: Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, *34*, 171–175.
- Parisotto, E. B., Garlet, T. R., Cavalli, V. L. de L. O., Zamoner, A., da Rosa, J. S., Bastos, J., ... Wilhelm Filho, D. (2014). Antioxidant intervention attenuates oxidative stress in children and teenagers with Down syndrome. *Research in Developmental Disabilities*, *35*(6), 1228–36. doi:10.1016/j.ridd.2014.03.013
- Patten, A. R., Moller, D. J., Graham, J., Gil-Mohapel, J., & Christie, B. R. (2013). Liquid diets reduce cell proliferation but not neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Neuroscience*, *254*, 173–84. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.09.024
- Paul, C.-M., Magda, G., & Abel, S. (2009). Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behavioural Brain Research*, *203*(2), 151–64. doi:10.1016/j.bbr.2009.05.022
- Paus, T. (2010). A primer for brain imaging: a tool for evidence-based studies of nutrition? *Nutrition Reviews*, *68 Suppl 1*, S29–37. doi:10.1111/j.1753-4887.2010.00327.x

- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *14*(3), 149–167. doi:10.1016/0165-0270(85)90031-7
- Pennington, B. F., Moon, J., Edgin, J., Stedron, J., & Nadel, L. (2003). The Neuropsychology of Down Syndrome: Evidence for Hippocampal Dysfunction. *Child Development*, *74*(1), 75–93. doi:10.1111/1467-8624.00522
- Penzes, P., Cahill, M. E., Jones, K. A., VanLeeuwen, J.-E., & Woolfrey, K. M. (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, *14*(3), 285–93. doi:10.1038/nn.2741
- Pioli, E. Y., Gaskill, B. N., Gilmour, G., Tricklebank, M. D., Dix, S. L., Bannerman, D., & Garner, J. P. (2013). An automated maze task for assessing hippocampus-sensitive memory in mice. *Behavioural Brain Research*, *261C*, 249–257. doi:10.1016/j.bbr.2013.12.009
- Pitkin, R. M. (2007). Folate and neural tube defects. *Am J Clin Nutr*, *85*(1), 285S–288.
- Pueschel, S. M. (2006). The effect of acetyl-L-carnitine administration on persons with Down syndrome. *Research in Developmental Disabilities*, *27*(6), 599–604. doi:10.1016/j.ridd.2004.07.009
- Pueschel, S. M. . P. J. K. (1992). *Biomedical Concerns in Persons with Down Syndrome* (p. 336). Baltimore: Brookes Publishing Company.
- Pulsifer, M. B. (1996). The neuropsychology of mental retardation. *Journal of the International Neuropsychological Society : JINS*, *2*(2), 159–176. doi:10.1192/bjp.bp.110.079061
- Purpura, D. P. (1974). Dendritic spine “dysgenesis” and mental retardation. *Science (New York, N.Y.)*, *186*(4169), 1126–1128. doi:10.1126/science.186.4169.1126
- Qin, X., Xiaojian, S., Ronggan, L., Yuxian, W., Zhunian, T., Shouji, G., & Heimbach, J. (2006). Subchronic 90-day oral (Gavage) toxicity study of a Luo Han Guo mogroside extract in dogs. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *44*(12), 2106–9. doi:10.1016/j.fct.2006.07.023
- Rabbani, M., Sajjadi, S. E., & Zarei, H. R. (2003). Anxiolytic effects of *Stachys lavandulifolia* Vahl on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *89*(2-3), 271–276. doi:10.1016/j.jep.2003.09.008
- Rachubinski, A. L., Crowley, S. K., Sladek, J. R., Maclean, K. N., & Bjugstad, K. B. (2012). Effects of Neonatal Neural Progenitor Cell Implantation on Adult

Neuroanatomy and Cognition in the Ts65Dn Model of Down Syndrome. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0036082

- Reichelt, K. L., Ekrem, J., & Scott, H. (1990). Gluten, milk proteins and autism: dietary intervention effects on behavior and peptide secretion. *Journal of Applied Nutrition*, 42(1), 1–11.
- Rochefort, N. L., & Konnerth, A. (2012). Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO Reports*. doi:10.1038/embor.2012.102
- Roizen, N. J. (2002). Medical care and monitoring for the adolescent with Down syndrome. *Adolescent Medicine (Philadelphia, Pa.)*, 13(2), 345–58, vii.
- Ross, a P., Bartness, T. J., Mielke, J. G., & Parent, M. B. (2009). A high fructose diet impairs spatial memory in male rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(3), 410–6. doi:10.1016/j.nlm.2009.05.007
- Rueda, N., Flórez, J., & Martínez-Cué, C. (2008). Chronic pentylentetrazole but not donepezil treatment rescues spatial cognition in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Neuroscience Letters*, 433(1), 22–7. doi:10.1016/j.neulet.2007.12.039
- Rueda, N., Flórez, J., & Martínez-Cué, C. (2008). Effects of chronic administration of SGS-111 during adulthood and during the pre- and post-natal periods on the cognitive deficits of Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Behavioural Brain Research*, 188(2), 355–67. doi:10.1016/j.bbr.2007.11.020
- Rueda, C., Llorens-Martín, M., Flórez, J., Valdizán, E., Banerjee, P., Trejo, J. L.; Martínez-Cué, C. (2010). Memantine normalizes several phenotypic features in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Journal of Alzheimer's Disease*, 21, 277–290.
- Ruparelia, A., Pearn, M. L., & Mobley, W. C. (2012). Cognitive and pharmacological insights from the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Current Opinion in Neurobiology*. doi:10.1016/j.conb.2012.05.002
- Salas, M., Díaz, S., & Nieto, A. (1974). Effects of neonatal food deprivation on cortical spines and dendritic development of the rat. *Brain Research*, 73(1), 139–144. doi:10.1016/0006-8993(74)91012-9
- Saunders, J., Smith, T., & Stroud, M. (2011). Malnutrition and undernutrition. *Medicine*. doi:10.1016/j.mpmed.2010.10.007
- Schapiro, M. B., Ball, M. J., Grady, C. L., Haxby, J. V., Kaye, J. A., & Rapoport, S. I. (1988). Dementia in Down's syndrome: Cerebral glucose utilization, neuropsychological assessment, and neuropathology. *Neurology*, 38(6), 938–938. doi:10.1212/WNL.38.6.938

- Schmidt-Sidor, B., Wisniewski, K. E., Shepard, T. H., & Sersen, E. A. (1990). Brain growth in Down syndrome subjects 15 to 22 weeks of gestational age and birth to 60 months. *Clinical Neuropathology*, *9*(4), 181–90.
- Segal, M., & Andersen, P. (2000). Dendritic spines shaped by synaptic activity. *Current Opinion in Neurobiology*, *10*(5), 582–586. doi:10.1016/S0959-4388(00)00123-9
- Sheng, M., & Hoogenraad, C. C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annual Review of Biochemistry*, *76*, 823–47. doi:10.1146/annurev.biochem.76.060805.160029
- Sherman, P. M., Cabana, M., Gibson, G. R., Koletzko, B. V., Neu, J., Veereman-wauters, G., ... Walker, W. A. (2009). Potential Roles and Clinical Utility of Prebiotics in Newborns, Infants, and Children: Proceedings from a Global Prebiotic Summit Meeting, New York City, June 27-28, 2008. *The Journal of Pediatrics*, *155*(5), S61–S70. doi:10.1016/j.jpeds.2009.08.022
- Shichiri, M., Yoshida, Y., Ishida, N., Hagihara, Y., Iwahashi, H., Tamai, H., & Niki, E. (2011). α -Tocopherol suppresses lipid peroxidation and behavioral and cognitive impairments in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Free Radical Biology & Medicine*, *50*(12), 1801–1811. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.023
- Shukitt-Hale, B., McEwen, J. J., Szprengiel, A., & Joseph, J. A. (2004). Effect of age on the radial arm water maze—a test of spatial learning and memory. *Neurobiology of Aging*, *25*(2), 223–229. doi:10.1016/S0197-4580(03)00041-1
- Song, W. O., Wang, Y., Chung, C. E., Song, B., Lee, W., & Chun, O. K. (2012). Is obesity development associated with dietary sugar intake in the U.S.? *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, *28*(11-12), 1137–41. doi:10.1016/j.nut.2012.03.008
- Stackman, R. W., Eckenstein, F., Frei, B., Kulhanek, D., Nowlin, J., & Quinn, J. F. (2003). Prevention of age-related spatial memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by chronic Ginkgo biloba treatment. *Experimental Neurology*, *184*(1), 510–520. doi:10.1016/S0014-4886(03)00399-6
- Stanford. (2014). Y Maze Spontaneous Alternation Test. Retrieved January 30, 2014, from http://sbfnl.stanford.edu/cs/bm/lm/bml_ymaze.html
- Stoll, C., Alembik, Y., Dott, B., & Roth, M. P. (1990). Epidemiology of Down syndrome in 118,265 consecutive births. *American Journal of Medical Genetics. Supplement*, *7*, 79–83.
- Szuran, T. F., Pliška, V., Pokorný, J., & Welzl, H. (2000). Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze

- performance. *Physiology & Behavior*, 71(3-4), 353–362. doi:10.1016/S0031-9384(00)00351-6
- Tagliabata, G., Hogan, D., Zhang, W.-R., & Dineley, K. T. (2009). Intermediate- and long-term recognition memory deficits in Tg2576 mice are reversed with acute calcineurin inhibition. *Behavioural Brain Research*, 200(1), 95–9. doi:10.1016/j.bbr.2008.12.034
- Tavares, M. A., Paula-Barbosa, M. M., & Gray, E. G. (1983). Dendritic spine plasticity and chronic alcoholism in rats. *Neuroscience Letters*, 42(3), 235–238. doi:10.1016/0304-3940(83)90267-7
- Télez, L. A., Pérez, I. O., Simon, S. A., & Gutiérrez, R. (2012). Transitions between sleep and feeding states in rat ventral striatum neurons. *Journal of Neurophysiology*, 108(6), 1739–51. doi:10.1152/jn.00394.2012
- Tulving, E., Donaldson, W., & Bower, G. H. (1972). *Organization of memory*. Washington, D.C.: Academic Press.
- Uyanik, M., Bumin, G., & Kayihan, H. (2003). *Comparison of different therapy approaches in children with Down syndrome. Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society* (Vol. 45, pp. 68–73). doi:10.1046/j.1442-200X.2003.01670.x
- Valenti, D., De Rasmio, D., Signorile, A., Rossi, L., de Bari, L., Scala, I., ... Vacca, R. A. (2013). Epigallocatechin-3-gallate prevents oxidative phosphorylation deficit and promotes mitochondrial biogenesis in human cells from subjects with Down's syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1832(4), 542–52. doi:10.1016/j.bbadis.2012.12.011
- Van den Heuvel, E. G., Muys, T., van Dokkum, W., & Schaafsma, G. (1999). *Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. The American journal of clinical nutrition* (Vol. 69, pp. 544–548).
- White, J., & Wolraich, M. (1995). Effect of sugar on behavior and mental performance. *Am J Clin Nutr*, 62(1), 242S–247. Retrieved from <http://ajcn.nutrition.org/cgi/content/long/62/1/242S>
- Whiteley, P., Shattock, P., Knivsberg, A.-M., Seim, A., Reichelt, K. L., Todd, L., ... Hooper, M. (2012). Gluten- and casein-free dietary intervention for autism spectrum conditions. *Frontiers in Human Neuroscience*, 6(January), 344. doi:10.3389/fnhum.2012.00344
- WHO. (2014). Nutrición. World Health Organization. Retrieved January 30, 2014, from <http://www.who.int/topics/nutrition/es/>

- Winters, B. D., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2008). Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *32*(5), 1055–70. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.04.004
- Winters BD, Saksida LM, B. T. (2006). Paradoxical Facilitation of Object Recognition Memory after Infusion of Scopolamine into Perirhinal Cortex: Implications for Cholinergic System Function. *Journal of Neuroscience*, *26*, 9520–9529.
- Wolraich, M. L. (1995). The Effect of Sugar on Behavior or Cognition in Children. *JAMA*, *274*(20), 1617. doi:10.1001/jama.1995.03530200053037
- Wright, A. A. (2007). An experimental analysis of memory processing. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, *88*(3), 405–433.
- Yasumatsu, N., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Noguchi, J., & Kasai, H. (2008). Principles of long-term dynamics of dendritic spines. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(50), 13592–608. doi:10.1523/JNEUROSCI.0603-08.2008
- Yokozawa, T., Kim, H. Y., & Cho, E. J. (2002). Erythritol attenuates the diabetic oxidative stress through modulating glucose metabolism and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(19), 5485–5489.
- Zeisel, S. H. (1986). Dietary influences on neurotransmission. *Advances in Pediatrics*, *33*, 23–47.