

Nota del Ed. Ofrecemos este mes el Resumen y Comentario de dos estudios de investigación recién publicados. Aparentemente tratan de temas muy distintos, pero están vinculados por su relación con el gen DYRK1A, de tanta actualidad por el interés que ha suscitado el empleo de la epigallocatequina presente en el té verde para personas con síndrome de Down.

Estudio nº 1

La normalización de la actividad del gen Dyrk1A, en un modelo murino del síndrome de Down, corrige varios rasgos fenotípicos de la enfermedad de Alzheimer

(Normalizing the gene dosage of Dyrk1A in a mouse model of Down syndrome rescues several Alzheimer's disease phenotypes)

Susana García-Cerro, Noemí Rueda, Verónica Vidal, Sara Lantigua, Carmen Martínez-Cué
Neurobiology of Disease 106: 76–88, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2017.06.010>

RESUMEN

PLANTEAMIENTO

La neuropatología propia de la enfermedad de Alzheimer que se observa a lo largo de la vida de las personas con síndrome de Down se debe a la sobreexpresión de varios genes presentes en el cromosoma 21. Uno de ellos es, claramente, el gen APP: promueve la síntesis de la proteína preamiloide. Esta proteína sobreabunda en el síndrome de Down desde las primeras etapas, y de ella derivan algunos péptidos β -amiloide que son tóxicos y contribuyen a la patología cerebral propia de la enfermedad de Alzheimer.

Más recientemente se ha sugerido la implicación de otro gen que también se encuentra triplicado en el síndrome de Down: el DYRK1A. Codifica una cinasa que se encarga de fosforilar (incorporar grupos fosfato) a diversas proteínas, y con ello interviene en múltiples vías de señalización intracelular que contribuyen al normal funcionamiento del desarrollo cerebral y la actividad de las neuronas en el cerebro adulto. Pero cuando esta cinasa se encuentra en exceso, como es el caso del síndrome de Down, su exagerada acción fosforilante perturba el funcionamiento normal de la actividad cerebral. Y además, parece que contribuye a incrementar los procesos neurodegenerativos propios del envejecimiento, tanto normal como patológico.

En vista de ello, y dado que en el síndrome de Down el gen DYRK1A se encuentra triplicado, ¿podría contribuir, junto con otros genes como el APP, a desarrollar algunos de los procesos neurodegenerativos que vemos en las personas con síndrome de Down?

A esta pregunta tratan de contestar las autoras de este trabajo realizado en la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria, basándose en los siguientes hechos y utilizando como instrumento el ratón Ts65Dn, un reconocido modelo de síndrome de Down que posee triplicados tanto el gen *App* como el *Dyrk1A*:

1. El ratón Ts65Dn sufre a lo largo de su vida un modelo de neurodegeneración que, sin llegar a mostrar toda la patología cerebral propia de la enfermedad de Alzheimer, muestra muchos de sus rasgos, algunos muy significativos, como son: un declive en su capacidad cognitiva, una degeneración de neuronas colinérgicas en ciertos núcleos del cerebro, incrementos en los niveles de la proteína APP y de los péptidos tóxicos β -amiloide, y un exceso de fosforilaciones en las proteínas tau (recuérdese que la función de *Dyrk1A* es fosforilar). Esto último requiere explicación. La proteína tau se encuentra en las neuronas formando fibrillas cuya función es la de dar consistencia o soporte estructural a la célula; pero cuando esta proteína recibe o acumula demasiados radicales fosfato, se hace excesivamente rígida, se une a otras proteínas tau de la neurona, y terminan por paralizar la actividad intraneuronal y provocar su muerte: así es como se forman los ovillos neurofibrilares del cerebro, típicos de la enfermedad de Alzheimer.

2. Todo esto sucede en el ratón Ts65Dn que contiene tres copias de unos 100 genes similares a los del cromosoma 21 humano (por eso es un modelo de síndrome de Down). Entre esos genes triplicados, se encuentran varios de los que parecen contribuir al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, entre ellos el *App* y el *Dyrk1A*. Pues bien, si queremos conocer la contribución del gen *Dyrk1A* a la neuropatología por envejecimiento del ratón TS65DN, ¿qué pasa si conseguimos reproducir un ratón similar al Ts65Dn pero en el que hemos sustraído una copia de las tres *Dyrk1A*? Es decir, mantiene las tres copias de los demás genes pero sólo muestra dos del gen *Dyrk1A*; por así decir, hemos “normalizado” la presencia de este gen. ¿Seguirá mostrando la misma tendencia a la neurodegeneración patológica tipo Alzheimer?

MÉTODOS

Para poder responder a estas preguntas, las investigadoras cruzaron ratones trisómicos Ts65Dn (es decir, con 3 copias de *Dyrk1A*) con ratones que sólo tenían una copia de *Dyrk1A*. Y así obtuvieron tres tipos de ratones con 1, con 2 o con 3 copias de ese gen. Eso les permitió establecer y analizar una hermosa comparación entre los tres tipos de ratón, para poder discernir en qué grado, al sustraer una copia del gen *Dyrk1A*, se modifica la neuropatología del envejecimiento que se observa en los ratones que muestran tres copias de ese gen.

Obtenido suficientemente número de ratones en cada uno de los tres grupos, los dejaron crecer y analizaron toda una serie de parámetros relacionados con el envejecimiento cerebral en dos periodos: a los 5-6 meses de vida (adultez del ratón) y a los 13-14 meses (envejecimiento del ratón). Los parámetros analizados en diversas zonas del cerebro fueron: envejecimiento celular, densidad de neuronas colinérgicas, niveles de la proteína APP, carga de péptidos A β , proteína tau total y tau fosforilada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al comparar los datos obtenidos en los grupos de ratones trisómicos envejecidos que tenían 2 o 3 copias del gen *Dyrk1A*, comprobaron que la normalización de la dosis de ese gen concreto (grupo con 2 copias frente a grupo con 3 copias): (1) redujo la densidad de neuronas senescentes (envejecidas) en la corteza cingulada, en el hipocampo y en el septum; (2) impidió la degeneración de neuronas colinérgicas; (3) redujo la expresión de proteína APP en el hipocampo y la carga de péptidos A β en la corteza y en el hipocampo; y (4) redujo la fosforilación de tau en un sitio crítico y los niveles de proteína tau total en la corteza hipocampo y cerebelo.



Es decir, la normalización en el número de copias de *Dyrk1A*, a pesar de que los demás genes seguían triplicados, consiguió restaurar notablemente la presencia de ciertas alteraciones cerebrales que acompañan a la evolución patológica del ratón trisómico.

Esto parece indicar que la presencia de 3 copias de *Dyrk1A* juegan un importante papel en los procesos que conducen a la patología cerebral. Y sugieren, por tanto, que lo mismo puede suceder en la evolución patológica cerebral en el síndrome de Down que conduce hacia la enfermedad de Alzheimer.

Los resultados de este trabajo, además, contribuyen a reforzar la idea de que la proteína APP y los neuropéptidos β , responsables de la presencia de β -amiloide en las placas seniles, y la proteína tau hiperfosforilada responsable de la aparición de los ovillos neurofibrilares, mantienen una relación mutua en forma de círculo vicioso por la cual favorecen su crecimiento y mantenimiento.

COMENTARIO

Es evidente que este estudio contribuye de forma muy notable a resaltar la importancia del gen *DYRK1A*, presente en el cromosoma 21, en la biología cerebral. Establecido con relativa seguridad su papel en el desarrollo, por supuesto en complicidad con muchos otros genes, vemos que también contribuye poderosamente en la vida de la célula adulta, de manera que el exceso de dosis cuando aparece como tres copias en lugar de dos, se traduce en un incremento de actividad que resulta siendo tóxica para la célula, en este caso la neurona, contribuyendo de ese modo a la instauración de un envejecimiento cerebral patológico.

Si esta hipótesis se va conformando, es ineludible, una vez más, considerar la posibilidad de que una sustancia que frene la hiperactividad fosforilante de la proteína *DYRK1A* (derivada de la hiperactividad codificante del gen en exceso), contrarreste también su acción tóxica sobre la vida de la neurona. Vuelve, entonces, a considerarse el posible valor de la epigalocatequina, producto natural del té verde, como elemento que pueda detener o moderar la evolución hacia el envejecimiento patológico de las personas con síndrome de Down.

Pero la utilización beneficiosa de la epigalocatequina en las personas con síndrome de Down y en los modelos animales de dicho síndrome sigue suscitando numerosas dudas. En primer lugar,

porque su acción sobre cognición y conducta, sólo comprobada hasta ahora en jóvenes adultos, es moderada y exige ser acompañada por sistemáticos ejercicios cognitivos. Y en segundo lugar, porque van apareciendo resultados negativos en modelos animales, que obligan a tener muy en cuenta qué tipo de preparado es apropiado, qué dosis, cuánto pasa al cerebro, en qué etapa de la vida puede resultar, o no, beneficiosa.

Algunas de estas contradicciones quedan reflejadas en otro reciente artículo que a continuación resumimos, publicado también este año por el grupo de Roper en Estados Unidos. En todo caso, no se debe olvidar que existen otros productos que también inhiben a la proteína DYRK1A; es decir, si el papel del gen DYRK1A y de su proteína resultante es tan decisivo, será oportuno probar también otros productos inhibidores, distintos de la epigallocatequina.

Estudio nº 2

El consumo de epigallocatequina-3-galato en el modelo Ts65Dn de síndrome de Down fracasa en la mejora de déficit conductuales y resulta perjudicial para el desarrollo óseo

(Epigallocatechin-3-gallate consumption in the Ts65Dn model of Down syndrome fails to improve behavioral deficits and is detrimental to skeletal phenotypes)

Megan stringer, Irushi Abeysekera, Jared Thomas, Jonathan LaCombe, Kailey Stanconbe, Robert J Stewart, Karl J Dria, Joseph M Wallace, Charles R Goodlett, Randall J Roper
Physiology & Behavior 177: 230-241, 2017

RESUMEN

PLANTEAMIENTO

El gen DYRK1A se encuentra triplicado tanto en la trisomía 21 humana como en el ratón TS65Dn, un modelo de síndrome de Down, y está implicado en un buen número de vías críticas para el desarrollo neurológico y en la osteoclastogénesis o producción de osteoclastos. Los osteoclastos son células del hueso que intervienen de manera muy importante en el modelado, recambio y regeneración de las trabéculas del hueso y su calcificación. La epigallocatequina-3-galato (EGCG) inhibe la actividad de la proteína Dyrk1A.

El grupo de investigadores que firman este estudio había demostrado previamente que el tratamiento con EGCG pura, a la dosis de 10 mg/kg/día, mejoraba las anomalías del esqueleto propias de los ratones Ts65Dn (que recuerdan las propias del síndrome de Down), si bien esa misma dosis, así como la de 20 mg/kg/día, no mejoraban el aprendizaje visoespacial en el test de Morris ni el reconocimiento de objetos novedosos (grupo de Roper: Stringer et al., 2015; Blazek et al., 2015). En contraste con estos resultados, otro estudio con EGCG en este mismo modelo de ratón obtuvo resultados diferentes (De la Torre et al., 2014): la EGCG que se administró era un suplemento (Life Extension® Mega Green Tea Extract, Lightly Caffeinated), y fue administrada a razón de 2-3 mg/día por ratón (es decir, una dosis diaria de 180-120 mg/kg [para un ratón de 25 g], que daría una dosis final efectiva de 40-60 mg/kg/día teniendo en cuenta su degradación). Esta dosis había sido capaz de mejorar el aprendizaje del ratón y la conducta tigmotáctica en el test de Morris, y mejoró el reconocimiento de objetos nuevos.

¿A qué podrían deberse estos resultados tan contradictorios entre los del grupo de Roper y el de De la Torre? El presente estudio trata de analizar si la discordancia entre ellos se debe a las notables diferencias en la dosis de EGCG, claramente menor en el estudio del grupo de Roper. Para ello administraron una dosis de EGCG pura de 150 mg/kg/día durante 7 semanas, empezando unos 3 días después del destete. Además, y puesto que la dosis ahora utilizada era muy superior a la que había mostrado mejorar la calidad del hueso, analizaron si la nueva mayor dosis y administrada durante mayor tiempo podría mejorar más aún la función del esqueleto. De manera adicional, analizaron también los cambios reales en el nivel de proteína Dyrk1A mediante cuantificación de la actividad cinásica (recordemos que la proteína Dyrk1A es una cinasa); de este modo se podrá comprobar el grado en que la EGCG, que inhibe la actividad de esta cinasa, está siendo realmente activa y cumple la función que se le supone.

MÉTODOS

La ambición de los objetivos obligó a los autores a disponer de múltiples técnicas de estudio. Las de tipo conductual incluyeron: a) observación y evaluación de la conducta de los animales en un ambiente nuevo con múltiples compartimentos, en el que se mueven espontáneamente; b) reconocimiento de objetos novedosos; c) equilibrio en el tránsito por una viga de madera; d) test de Morris. Las de esqueleto óseo incluyeron una tomografía computerizada del fémur y la resistencia mecánica del hueso. Las bioquímicas consistieron en medir los niveles de la proteína Dyrk1A y cuantificar su actividad cinásica en diversas regiones del cerebro y en el hueso.

La administración de EGCG (50 mg/kg/día) se inició el día 24 postparto y duró hasta el día 68 postparto. A lo largo de ese tiempo los animales fueron sometidos a las distintas pruebas.

RESULTADOS

Fueron realmente imprevistos. La EGCG no fue capaz de mejorar las pruebas de cognición/conducta de los ratones trisómicos en la mayoría de las pruebas realizadas, ni los resultados relacionados con el esqueleto. Sólo mejoró parcialmente la medición que valoraba la decisión del ratón de correr riesgo en una de las pruebas. Pero no mejoró los resultados ni en el test de Morris ni en el de objetos novedosos. Estos resultados confirman los obtenidos por el mismo grupo investigador con una dosis menor, que tampoco fue capaz de mejorar la cognición/conducta, pero contradicen los conseguidos por el grupo de De la Torre con la dosis alta, a pesar de que la dosis del presente estudio estuvo a la altura de la dosis empleada por De la Torre. Hay que añadir que en otro estudio del grupo de Dierssen (Catuara-Solarz et al., 2015) realizado en ratones Ts65Dn de 5-6 meses de edad, la EGCG tampoco logró mejorar el aprendizaje, y sólo lo hizo cuando se añadió enriquecimiento ambiental al fármaco.

Es llamativo que la dosis alta de EGCG empeoró la estructura ósea y sus propiedades mecánicas, tanto en los ratones trisómicos como en los euploides. Y esto contradice lo descrito por los mis-



mos autores cuando utilizaron dosis más bajas. Lo que hace pensar que el efecto de la EGCG sobre el esqueleto no es uniforme y crece linealmente con la dosis sino que, por el contrario, puede tener un efecto contrapuesto: mejorar a dosis bajas y empeorar a dosis más altas.

Otro aspecto importante del estudio fue la evaluación de la actividad de la proteína *Dyrk1A*, presuntamente inhibida bajo la acción de la EGCG. El resultado más destacable fue la falta de correlación entre el nivel de proteína alcanzado en el cerebro y el grado de actividad cinásica. De hecho, no observaron diferencias en actividad cinásica entre ratones euploides y trisómicos en ninguna de las tres regiones cerebrales estudiadas. ¿Será que la EGCG no atraviesa suficientemente bien la barrera hematoencefálica y no llega al cerebro?

CONCLUSIÓN

A juicio de los autores, sus resultados destacan que existen todavía importantes brechas a la hora de saber el grado en que la EGCG muestra un valor terapéutico para mejorar ciertos rasgos propios del síndrome de Down, y que habrán de ser abordadas en el futuro mediante los modelos animales. Estos modelos habrán de concentrarse en estos cuatro aspectos críticos del tratamiento con EGCG: (1) el momento o periodo en que la EGCG ha de ser administrada, teniendo en cuenta posibles efectos secundarios, y la duración del tratamiento; (2) la dosis óptima de administración; (3) el tipo de suplemento que se administre, ya que en este estudio -especialmente negativo- se empleó EGCG pura, mientras que en el más positivo de De la Torre fue el suplemento denominado *Life Extension® Mega Green Tea Extract, Lightly Caffeinated* que contiene otras catequinas; (4) los mecanismos que expliquen los efectos terapéuticos de la EGCG: si son debidos a la inhibición de la *Dyrk1A* o a otros posibles.

Tampoco se debe olvidar que algunos de los efectos de la EGCG sobre la actividad *Dyrk1A*, descritos por algunos autores, fueron conseguidos en ratones transgénicos; es decir, en un ambiente cromosómico normal. Es posible que en un ambiente trisómico como es el del ratón *Ts65Dn*, la situación sea muy distinta.

REFERENCIAS

- Blazek JD. et al. Rescue of the abnormal skeletal phenotype in Ts65Dn Down syndrome mice using genetic and therapeutic modulation of trisomic Dyrk1A. *Hum. Mol. Genet.* 24: 5687-5696, 2015.
- Catuara-Solarz S. et al. Principal component analysis of the effects of environmental enrichment and (-)-epigallocatechin-3-gallate on age-associated learning deficits in a mouse model of Down syndrome. *Front. Behav. Neurosci.* 9: 330, 2015.
- De la Torre R. et al. Epigallocatechin-3-gallate, a DYRK1A inhibitor, rescues cognitive deficits in Down syndrome mouse models and in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 58: 278-288, 2014.
- Stringer M. et al. Low dose EGCG treatment beginning in adolescence does not improve cognitive in a Down syndrome mouse model. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 138:70-79, 2015.

COMENTARIO

Los resultados de este segundo estudio, realizado en ratones trisómicos Ts65Dn, cuestionan algunos de los principios sobre los que se basa la propuesta de administrar EGCG a las personas con síndrome de Down. Si algo queda claro es que la diversidad de abordajes, dosis de tratamiento, tipos de extractos, etapa de la vida en que se administra el producto, etc., originan resultados contradictorios que nos llevan a la confusión. Este estudio, además, señala efectos contraproducentes sobre el hueso, al menos a la dosis y edad temprana en que se administró. Y suscita la duda sobre si la acción de la EGCG pueda ser debida realmente a su inhibición sobre la actividad de la proteína Dyrk1A.

Todo ello no hace más que confirmar la prudencia que siempre hemos recomendado a la hora de administrar esta nueva sustancia. Hasta ahora, hay sólo un estudio clínico que muestra efectos positivos moderados en jóvenes adultos con síndrome de Down cuando la EGCG va acompañada de energética y constante estimulación cognitiva. Nos consta que algunas familias están dando EGCG a sus hijos pequeños. El estudio actual destaca la impropiedad de esta decisión, ya que puede originar problemas en el desarrollo del esqueleto.

COMENTARIO FINAL

¿Por qué hemos asociado estos dos artículos?

1. El primero nos ha llevado a la conclusión de que, quizá, la triple presencia del gen Dyrk1A en los ratones trisómicos Ts65Dn contribuya a facilitar el desarrollo de alteraciones neuropatológicas asociadas a la enfermedad de Alzheimer. Podría ocurrir lo mismo en las personas con síndrome de Down.
2. La epigallocatequina (EGCG) es un foco de indudable atención y protagonismo en el actual mundo de la investigación y la clínica sobre el síndrome de Down. Y ello se debe a que se ha asociado sus efectos a la inhibición que ejerce sobre la hiperactividad de la proteína Dyrk1A, resultante de las tres copias de gen DYK1A.
3. Por eso, es fácil que algunos propongan ensayar la actividad de la EGCG en personas adultas con síndrome de Down, para ver si protege frente a la evolución hacia el Alzheimer.
4. Sin embargo, el segundo artículo nos señala las muchas dudas de fondo que existen todavía acerca de la acción beneficiosa de la EGCG en su acción sobre cognición y conducta. Por lo que es preciso extremar la prudencia a la hora de hacer recomendaciones, y ensayar también la utilización de otras moléculas inhibitoras de la actividad de la proteína Dyrk1A.