

# Original

## El envejecimiento en el síndrome de Down: Dyrk1A como gen candidato para el declive cognitivo\*

María Martínez de Lagrán<sup>1,2</sup>, Analía Bortolozzi<sup>3</sup>, Juan Gispert<sup>4</sup>, Olga Millán<sup>4</sup>, Francesc Artigas<sup>3</sup>, Cristina Fillat<sup>1,2</sup>, María del Mar Dierssen<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa Genes y Enfermedad, Centro de Regulación Genómica, (CRG-UPF) PRBB, Barcelona, España.

<sup>2</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Raras (CIBER-RER), Barcelona, España

<sup>3</sup> Departamento de Neuroquímica, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC), IDIBAPS, Barcelona, España.

<sup>4</sup> Departamento de Imagen Animal, Institut d'Alta Tecnología (IAT-CRC Corporació Sanitària), PRBB, Barcelona, España

Correspondencia: mara.dierssen@crg.es

Article rebut: 05.09.08

### Resumen

Hemos centrado esta revisión en el trabajo realizado con el objetivo de determinar el papel del gen DYRK1A en el proceso degenerativo presente en el síndrome de Down (SD), y sus mecanismos patogenéticos, utilizando como aproximación experimental modelos de ratón genéticamente modificados con diferente dosis de este gen. En base a estos resultados, proponemos que Dyrk1A es un gen dosis-sensible que, por su patrón de expresión y por los sustratos de fosforilación identificados, podría participar en las alteraciones motoras, cognitivas y el proceso neuropatológico tipo enfermedad de Alzheimer en personas con SD.

**Palabras clave.** Aneuploidía. Genes dosis sensibles. Alteraciones motoras. Sistema dopamínérigo.

***Ageing in Down Syndrome: DYRK1A As a Candidate Gene for Cognitive Decline***

### Abstract

The DYRK1A gene has been implicated in the degenerative process observed in Down syndrome; however, its precise role and pathogenetic mechanisms are still unclear. This paper reviews experimental work conducted in genetically modified mice with differing doses of the gene. The results suggest that DYRK1A is a dose-sensitive gene that may participate in motor and cognitive disturbances and in Alzheimer-like neuropathologic

processes in persons with Down syndrome, according to the gene's expression pattern and the phosphorylation substrates identified.

**Keywords.** Aneuploidy. Dose-sensitive genes. Motor skills disorders. Dopaminergic system.

### El síndrome de Down: una enfermedad humana dependiente de dosis génica

La aneuploidía, se define como un número anormal de copias de una región genómica, y es una causa común de enfermedades genéticas humanas. Clásicamente, el término aneuploidía se restringía a la presencia de copias supranumerarias (trisomías) o perdida (monosomía) de cromosomas completos, pero esta definición se ha extendido para incluir delecciones o duplicaciones de regiones subcromosómicas o de genes únicos. En las monosomías se incluyen las haploinsuficiencias, en las que una única copia de un gen o un elemento funcional genómico no es suficiente para que lleve a cabo su función normal. La importancia de la aneuploidía con frecuencia no se pondera debido a que la mayor parte de sus efectos se producen durante el periodo embrionario o fetal. La aneuploidía se relaciona con la alteración de los niveles de expresión génica de genes específicos, denominados por este motivo genes dosis-sensibles, pero su patogenia molecular prácticamente no se conoce. La identificación de genes con un impacto fenotípico de cambio de dosis es crucial para comprender no solamente estos síndromes sino variantes de número de copia presentes en la población general con posibles consecuencias patogénicas.

\*Trabajo galardonado con el 2º Premio Ramon Trias Fargas de Investigación sobre el síndrome de Down.

Este trabajo ha sido financiado mediante ayuda de la Fundación Jérôme Lejeune, Fundació Marató TV3, Fundación Ramón Aceres, ANEUPCOIDY No. 037627 (EP6-2005-CITESCIHEALTH-6) Ministerio de Ciencia y Tecnología SAF 2007-60827.

cas. Además, permitirá posiblemente identificar dianas moleculares con potencial terapéutico. El prototipo de enfermedad por exceso de material genético es la trisomía del par 21 o síndrome de Down (SD) y algunos síndromes de microdeleción constituyen los modelos más frecuentes de monosomía. Una de las preguntas clave en el SD se refiere al origen de las alteraciones neuropatológicas presentes. Dada la relativa integridad de la estructura histológica del cerebro en el momento del nacimiento y la presencia de los fenómenos neurodegenerativos a lo largo de toda la vida de las personas con SD, se viene proponiendo que se trata de un proceso patológico de carácter neurodegenerativo.

### El proceso neurodegenerativo en el síndrome de Down: consecuencias a nivel cognitivo

Los pacientes adultos con SD tienen un mayor riesgo de desarrollar demencia tipo Alzheimer que la población general. Sin embargo, existe una gran variabilidad interindividual en la edad de inicio de la demencia en las personas con SD y en su evolución. Aún así, la edad de aparición es más temprana (World Health Organisation 1992), siendo la prevalencia del 9,4% en el rango de edad de 40-49 años, del 36,1% entre 50-59 años y del 54,5% para el intervalo de 60-69 años.

El mayor problema con que se enfrenta el clínico a la hora de determinar el deterioro cognitivo en pacientes con SD es la presencia de un retraso mental previo que a su vez es muy variable. Por ello, un diagnóstico fiable requiere conocer el punto de partida intelectual y adaptativo del paciente, que si es moderado presenta menor riesgo de demencia que el grado profundo o severo (1). Por otra parte, el deterioro intelectual que aparece en la edad adulta obliga a descartar otros procesos, frecuentes en el SD, como el hipotiroidismo, la apnea del sueño, la depresión o la disminución de la capacidad auditiva o visual, ya que pueden provocar trastornos de la conducta que asemejen una demencia. Una vez descartada la comorbilidad, en los pacientes con SD se utilizan unas escalas de evaluación psicométrica que han sido progresivamente adaptadas y perfeccionadas para su aplicación en personas con deficiencia mental previa (2). Es necesario también determinar la evolución temporal del declive cognitivo. En este sentido, algunos síntomas, como el deterioro del lenguaje o los trastornos de la marcha suelen marcar las fases iniciales del deterioro. Esta progresiva pérdida funcional puede ser utilizada como un índice de demencia en los pacientes con SD.

Las áreas de afectación son:

1. Memoria. Problemas en la adquisición de nueva información: eventos sociales, ubicación de objetos colados recientemente o tareas rutinarias.
2. Otras funciones cognitivas. Cambios o deterioros en la capacidad de juicio y el razonamiento, en los hábitos, en el aseo personal, etc.
3. Orientación. Pérdida progresiva de la orientación en tiempo y espacio.
4. Control emocional, motivación, conducta social. Cambios en el estado emocional, irritabilidad, apatía, re-

tramiento social, cambios de humor, reducción de la actividad en general, alucinaciones, aparición de conductas anómalas (agresividad, pérdida de atención).

Posteriormente se pueden producir trastornos funcionales progresivos con cambios de personalidad, períodos crecientes de apatía e inactividad, pérdida de las habilidades de adaptación cotidiana, de la memoria visual, reducción del lenguaje expresivo, confusión y desorientación, hiperreflexia y otros signos neurológicos como convulsiones, o estereotipias.

### El síndrome de Down como modelo de fases predemenciales de la enfermedad de Alzheimer

Desde hace años se viene proponiendo la relación entre enfermedad de Alzheimer (EA) y SD, de forma que se considera que el SD podría ser un modelo biológico de fases pre-demeniales de EA. Esta proposición se sustenta en: a/ la implicación de genes del cromosoma 21 (HSA21) en la patogenia de enfermedades neurodegenerativas y EA; b/ el hecho de que las personas con SD desarrollen en un 100% las alteraciones neuropatológicas propias de la EA; c/ el deterioro cognitivo asociado a la edad en SD evoluciona en bastantes casos de forma temprana hacia una demencia clínica tipo EA. Los pacientes con SD presentan en edades tempranas lesiones tipo-Alzheimer cuya progresión temporal, con acumulación de A<sub>B</sub> en placas difusas (primero A<sub>B</sub>42 y posteriormente A<sub>B</sub>40), y aparición de microgliosis y astroglisis y finalmente de ovillos neurofibrilares, es representativa de la secuencia patogénica que ocurre en la EA. En el SD, en la segunda o tercera década de vida se detecta la presencia de proteína  $\beta$ -amiloide, y hacia los 35 años aparecen las placas neuríticas y los ovillos neurofibrilares. La distribución de estas lesiones y su composición es similar a la descrita en la EA, si bien existen algunas diferencias morfológicas en las placas seniles presentes en el SD, que son más grandes que en EA e incrementan su número con la edad, lo cual puede ser debido a un aumento en la producción más prolongado de proteína  $\beta$ -amiloide.

### Genes candidatos para el fenotipo neurodegenerativo: El gen Dyrk1A

La hipótesis del efecto de dosis génica en el SD se basa en que el desequilibrio de dosis de genes específicos conduciría a niveles elevados de proteínas concretas con consecuencias fenotípicas. Sin embargo sólo algunos de ellos podrán tener consecuencias observables debido a posibles efectos compensatorios. El aumento constitutivo en la expresión de otros genes del HSA21 podría estar relacionado con la generación de las lesiones neurodegenerativas. En este grupo de genes se podría incluir el gen SOD1 (codificador para la CuZn-superóxido dismutasa), ya que ratones transgénicos en los que el gen SOD1 humano está sobreexpresado muestran neuritas distróficas y estructuras anómalas en las terminaciones sinápticas, y el gen BACE2, una aspartil proteasa implicada en EA. En este trabajo nos centramos en Dyrk1A, una kinasa que podría ser un buen candidato para explicar las alteraciones cerebrales observadas en el SD, dada su participación fisioló-

gica en diferentes aspectos del neurodesarrollo, como la proliferación, la formación de conexiones neurales y la remodelación de éstas. El gen DYRK1A (Dual Specificity Yak1- Related Kinase) es un gen de copia única de 150 kb que se localiza entre las regiones 21q22.13 y 21q22.2 del HSA21 enmarcado dentro de la llamada región crítica del SD. DYRK1A codifica para una enzima llamada serin/treonin quinasa, con capacidad de autofosforilarse en residuos tirosina. Las secuencias del dominio catalítico y DH-box se encuentran altamente conservadas en los genes ortólogos de DYRK1A de diferentes especies invertebradas (Mnb en *D. melanogaster*; Yak1p, en *S. cerevisiae*; Pomp1 en *S. pombe*, mbk-1 en *C. elegans*). Esto significa que esta quinasa realiza una función muy importante que se conserva a lo largo de la evolución evolutivamente conservada en la regulación celular. DYRK1A presenta a su vez dos señales de localización nuclear (SLN), rica en histidinas responsables de su localización subcelular a nivel del núcleo sugiriendo su participación en funciones a este nivel. Así, ha sido demostrada su capacidad de participar en la regulación de la actividad de diferentes factores de transcripción como STAT3, Gli-1, FORKHEAD, eIF2Be, CREB, 14-3-3, NFAT a través de su fosforilación (3). El patrón de localización subcelular de DYRK1A con la posibilidad de trasladarse al núcleo y la variedad de sustratos tanto citoplasmáticos como nucleares sobre los que opera esta quinasa, sugieren la participación de DYRK1A en una gran variedad de funciones fisiológicas y, por tanto, posiblemente en diferentes procesos patológicos.

### Modelos murinos para estudiar los efectos de dosis génica

La primera consecuencia de la trisomía 21 es el incremento proporcional de la expresión génica en un 50%, lo que ha llevado a proponer un efecto de dosis génica. Por tanto, la generación de modelos de aneuploidía ha de garantizar que el grado de desequilibrio de la expresión sea similar, como sucede en nuestros modelos. Sin embargo, este efecto de dosis génica no siempre es proporcional a nivel traduccional, de manera que los niveles de proteína aumenten correlativamente con la dosis génica. Más aún cuando se trata de una quinasa muy posiblemente implicada en diversas vías de señalización celular, y que además puede actuar como factor de transcripción, como es el caso de Dyrk1A, el resultado del cambio de dosis puede ser la disregulación (por exceso o por defecto) de la transcripción de genes diana situados en diferentes cromosomas o la modulación de ciertas vías de señalización. Todo ello hace difícil predecir y establecer la relación entre el genotipo y el rasgo fenotípico, porque el fenotipo observado no es sólo el resultado directo de modificaciones en un gen determinado sino también de las modificaciones que secundariamente ocurrán a nivel del transcriptoma y del proteoma.

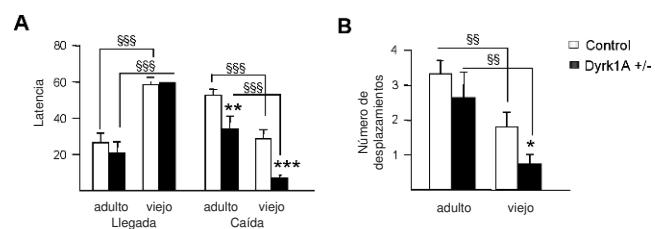
### Perfil del deterioro comportamental asociado a la edad en modelos de modificación de expresión de Dyrk1A

En nuestro laboratorio, el análisis de los modelos de

haploinsuficiencia y sobreexpresión de Dyrk1A ha revelado alteraciones sensoriales, motoras y cognitivas asociadas con el envejecimiento producidas por cambios en los niveles de expresión de Dyrk1A. A efectos de este trabajo, y considerando estas limitaciones conceptuales, se considera que el estudio del modelo haploinsuficiente aporta datos en lo referente al papel fisiológico del gen, ya que aquellas funciones que requieran la dosis adecuada del gen se verán alteradas, mientras que el modelo de sobreexpresión, en el que se inserta una o varias copias en exceso de un gen normal, se utiliza para analizar y estudiar la posible relevancia del desequilibrio de dosis de Dyrk1A, y por tanto el impacto patogénico de ésta en el SD.

### Alteraciones neurológicas y motoras

El sentido del equilibrio sufre un deterioro importante con el envejecimiento. El equilibrio está gobernado por los sistemas visual, propioceptivo y vestibular, de forma que la inadecuada recepción de la información propioceptiva, la falta de compensación mediante el sistema visual o alteraciones específicas del sistema vestibular pueden afectar la capacidad de ejecución de pruebas de equilibrio como la barra elevada o el rodillo giratorio. En nuestros experimentos (Figura 1) no se observaron alteraciones en el equilibrio en el ratón Dyrk1A+/- adulto, y la alteración asociada a la edad afectó en mayor grado al heterocigoto, indicando que el equilibrio y su patrón de deterioro asociado a la edad se ven afectados por la reducción de dosis de Dyrk1A. Por otra parte, las alteraciones de tono muscular y coordinación motora se observan en enfermedades que afectan al cerebelo o la neurona motora, regiones ambas en las que Dyrk1A se expresa en el animal adulto. En el ratón Dyrk1A+/- se observa una peor ejecución de la prueba de fuerza que se acentúa con la edad, indicando una afectación del tono muscular. La marcha en los ratones Dyrk1A+/-, evaluada mediante el análisis del patrón de pisadas, se caracteriza por un componente multifactorial que incluye un tiempo de reacción prolongado, pasos más cortos y bradicinesia. Los trastornos de la marcha pueden originarse por afectación del cerebelo, los ganglios basales o la corteza cerebral que ocasionan trastornos de la integración a nivel central, y al igual que el resto de las alteraciones moto-



**Figura 1.** Análisis de los cambios en coordinación motora asociados al envejecimiento mediante la prueba de la percha en ratones Dyrk1A+/-.

(A) Representación de la latencia de caída y llegada al extremo de la percha y (B) del número de desplazamientos realizados durante 60 segundos en los genotipos estudiados (control adulto n = 23; Dyrk1A +/- adulto n = 12; control viejo n = 21; Dyrk1A +/- viejo n = 16). Los datos se expresan como media ± E.E.M. Diferencias entre genotipos §§ P < 0.01, §§§ P < 0.001; diferencias entre edades en un mismo genotipo \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

ras, sufre un declive con la edad. El patrón observado es típico de alteraciones dopaminérgicas del sistema nigroestriatal, que son índice de la disfunción de los ganglios basales.

Los resultados sugieren que *Dyrk1A* estaría implicado de forma fisiológica en la funcionalidad de sistemas motores, y por tanto su sobreexpresión podría causar las alteraciones propias del SD. Para ello estudiamos el fenotipo del ratón transgénico *TgDyrk1A*, con un exceso de expresión del gen.

Entre las personas con SD se suele dar cierta torpeza motora, tanto gruesa (brazos y piernas) como fina (coordinación ojo-mano). Presentan lentitud en su ejecución motriz, mala coordinación (4), hipotonía muscular postnatal, deficiencias del sistema vestibular, afectación de la fuerza muscular, hiperlaxitud ligamentosa y diversas complicaciones en la transmisión cerebro-cerebelosa. Además, existe un retraso en la adquisición de la destreza motora fina y gruesa, con afectación de la realización de movimientos específicos, fundamentalmente los movimientos alternantes, aspectos que pueden ir modificándose con la edad (5). El modelo *TgDyrk1A* muestra algunas alteraciones similares a las observadas en pacientes con SD y en modelos murinos trisómicos.

Pese a que en el SD la afectación del sistema vestibular provoca déficit en el equilibrio, especialmente durante las primeras etapas de vida (6), la sobreexpresión de *Dyrk1A* no afectó a la realización de pruebas de equilibrio ni al deterioro propio de la edad permitiendo descartar el impacto patogenético de la sobreexpresión de *Dyrk1A* sobre el equilibrio. En lo que se refiere a la reducción de la contractilidad y tono muscular, éste es precisamente uno de los elementos que afectan el desarrollo motor en el SD, ya que determina trastornos en la postura y/o en el alineamiento de las extremidades, retrasando la adquisición de habilidades motoras. En el ratón *TgDyrk1A*, no hemos detectado alteraciones de la fuerza muscular ni de su deterioro con la edad. Finalmente, las alteraciones de la coordinación motora en los pacientes con SD se han relacionado con una disfunción cerebelar (7). Tanto en pacientes con SD como en modelos trisómicos en ratón, el cerebelo presenta una reducción significativa de tamaño por disminución del número de neuronas de la capa granular interna. En el ratón *TgDyrk1A* previamente se habían descrito alteraciones en coordinación motora utilizando la prueba de la percha (8). En nuestros experimentos, si bien el *TgDyrk1A* adulto mostró alteraciones en coordinación e integración motora, el análisis macroscópico del cerebelo del ratón *TgDyrk1A* no mostró alteraciones de tamaño ni de laminación. El envejecimiento produjo un empeoramiento de coordinación motora similar en ambos genotipos, sugiriendo que la sobreexpresión de *Dyrk1A* no afecta su patrón de deterioro. Al igual que en la EA, el deterioro de la marcha es uno de los primeros signos neurológicos del desarrollo de demencia en los pacientes adultos con SD. El ratón *TgDyrk1A* no presenta alteraciones en este parámetro durante la etapa adulta, pero los animales transgénicos viejos realizaron menos pasos y con zancla más larga que los controles. La marcha en los pacientes con SD se desarrolla tardíamente y se caracteriza

por patrones cinéticos anormales e inmaduros de la cadera y el tobillo (9, 10) debidos en parte a la hipotonía y la laxitud articular que afectarían a los biomecanismos de la marcha. De hecho el ratón *TgDyrk1A* presenta un claro retraso del desarrollo neuromotor durante el periodo postnatal, caracterizado por un retraso en la aparición de la locomoción y una persistencia de patrones motores inmaduros. De igual manera, el modelo trisómico *Ts65Dn* realiza pasos más cortos y con una capacidad de propulsión menor comparado con los animales euploides (11) de manera similar a lo que ocurre en los pacientes jóvenes con SD. Estos datos, junto con el hecho de que el ratón heterocigoto presente alteraciones de la marcha sugieren que *Dyrk1A* podría estar implicado en la regulación de los sistemas cerebrales implicados en la marcha a lo largo de la vida del animal, influyendo tanto en su desarrollo como en el proceso neurodegenerativo asociado al envejecimiento que los afecta.

### Participación del sistema dopaminérgico en la hipoactividad de *Dyrk1A* +/-

Dopamina (DA) es un neurotransmisor clave para aspectos motores. Así, la degeneración de grupos de neuronas dopaminérgicas (vía nigroestriatal) está asociada con las alteraciones motoras de la enfermedad de Parkinson. Además, la DA presente en el lóbulo frontal (vía mesocortical) es clave en procesos cognitivos que están alterados en el SD (memoria a corto plazo, comportamiento social, etc.). La relación existente entre DA y función cognitiva presenta forma de U invertida, de manera que tanto déficits como excesos de DA cortical (como los producidos por el estrés) se traducen en un deterioro de la función cognitiva.

En nuestros experimentos, la marcada hipoactividad que presenta el modelo de haploinsuficiencia de *Dyrk1A* junto con un patrón de la marcha, que guarda cierta similitud al observado en la enfermedad de Parkinson, sugería una alteración nigroestriatal, con hipoactividad dopaminérgica. En *Dyrk1A* +/- se observa una reducción en el número de neuronas dopaminérgicas en sustancia nigra y en la celularidad del estriado, indicando que la integridad de la vía nigroestriatal puede estar comprometida. Esta disminución de la celularidad condiciona, a nivel estriatal, la reducción de la concentración del metabolito de dopamina (DOPAC) debido a una desregulación de las enzimas metabolizantes (COMT y MAO), puesto que la concentración de dopamina (DA) tisular no estaba reducida y en estudios de microdialisis la liberación basal de DA a nivel estriatal era similar en ambos genotipos. Estos datos sugieren que la liberación y recaptación de DA podrían estar compensadas en el ratón heterocigoto a pesar de la reducción de celularidad (Figura 2). Tras la administración del agonista indirecto anfetamina que favorece la liberación de DA actuando a nivel vesicular y sobre la recaptación, el ratón *Dyrk1A* +/- presentaba una liberación de dopamina significativamente menor que el control. Por otro lado, la menor inhibición de la liberación de DA en *Dyrk1A* +/- tras la administración de apomorfina (agonista D1/D2) y quinpirole (agonista D2) indican que los mecanismos de

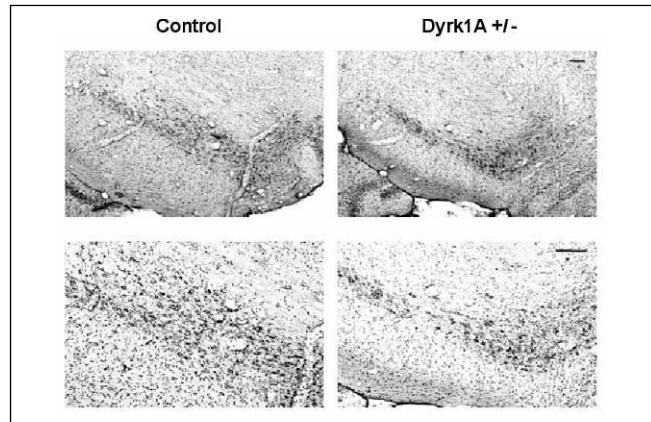
autoregulación mediados por autoreceptores en las neuronas dopaminérgicas podrían estar alteradas.

Estos resultados sugieren alteraciones presinápticas tanto en los mecanismos vesiculares de liberación de DA como a nivel de los autoreceptores, posiblemente como consecuencia de la pobre inervación del estriado. Es posible que además existan alteraciones a nivel postsináptico dado que Dyrk1A<sup>+/</sup> mostró una menor sensibilidad a la administración de dosis crecientes de los antagonistas de los receptores D1 (SCH-23390) y D2 (haloperidol), indicando una disfunción de las vías directa e indirecta que afectan al control motor. El bloqueo de los receptores postsinápticos estriatales D1, localizados en las neuronas estriatonigrales que proyectan directamente a la sustancia nigra pars reticulata, y D2, que modulan la actividad de ésta a través del globo pálido y el núcleo subtalámico, aumentan la inhibición tónica de los núcleos motores en el tálamo con la consiguiente inhibición de la actividad motora (Figura 3).

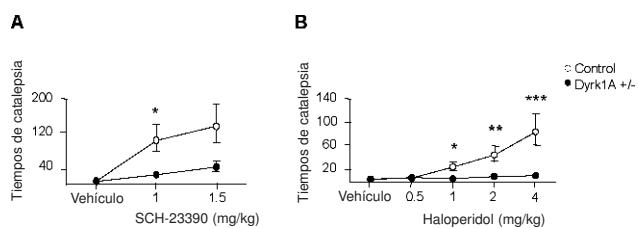
Finalmente, un estudio de microPET (imagen in vivo, Figura 4) tras la administración intraperitoneal de anfetamina, la activación cerebral fue menor en el ratón Dyrk1A<sup>+/</sup> comparada con sus respectivos controles, posiblemente, y correlacionando este dato con los estudios de microdiálisis, debido a una menor liberación de dopamina.

El conjunto de estos resultados sugiere que la carencia parcial de Dyrk1A desde el desarrollo afecta a la integridad del sistema dopaminérgico nigroestriatal, involucrando a Dyrk1A en el correcto funcionamiento de este sistema. Resta por analizar si las neuronas de la cercana área tegmental ventral, que proveen la inervación dopaminérgica cortical, están también alteradas. Una reducción común de ambas vías dopaminérgicas explicaría tanto las alteraciones cognitivas como motoras observadas en ratones deficientes en Dyrk1A.

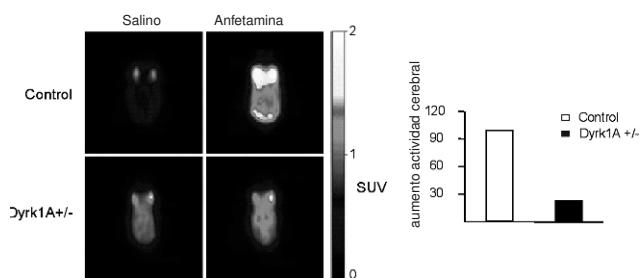
Si se sigue el conjunto de influencias inhibidoras y estimuladoras del esquema de los ganglios basales, puede observarse como el resultado del déficit de dopamina estriatal es una relativa hiperactividad de la vía indirecta que produce una desinhibición funcional del núcleo subtalámico y por lo tanto del globo pálido interno. Esto



**Figura 2.** Análisis estereológico de la sustantia nigra pars compacta en Dyrk1A<sup>+/</sup>-. El panel superior muestra secciones coronales representativas (50  $\mu$ m) de la SNPc de ambos genotipos tras la tinción con anticuerpo anti-tyrosin hidroxilasa (escala de la barra = 100  $\mu$ m).



**Figura 3.** Efecto cataléptico producido por antagonistas dopaminérgicos en Dyrk1A<sup>+/</sup>-. Tras la administración de dosis crecientes de un antagonista de los A) receptores D1 (SCH-23390) y B) receptores D2 (haloperidol), se evalúa el tiempo de catalepsia en la prueba de la barra en el modelo de haploinsuficiencia de Dyrk1A (controles n=10, Dyrk1A<sup>+/</sup>- n=9). Los datos se expresan como media  $\pm$  E.E.M. Diferencias entre genotipos \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.



**Figura 4.** Detección de la actividad metabólica cerebral mediante imagen in vivo de micro-PET. En el panel se muestran secciones transversales representativas de cada genotipo tras la administración IP del vehículo o anfetamina (4 mg/kg). El gráfico se corresponde con el porcentaje de incremento de actividad cerebral observado tras la administración de anfetamina en ambos genotipos.

causa una inhibición del tálamo y del córtex motor, lo que generaría la bradicinesia y la hipoactividad.

A parte de los diversos problemas específicamente motores que hemos discutido, los individuos con SD presentan un cierto grado de hiperactividad. Este fenotipo hiperactivo se observa también en los modelos de sobreexpresión de Dyrk1A, no solamente en el TgDyrk1A utilizado en este trabajo, sino también en el ratón YAC152F7 que sobreexpresa Dyrk1A entre otros genes, y presenta hiperactividad durante el desarrollo (12). Por otra parte, en varios modelos trisómicos se han observado cambios de actividad, como el ratón Ts65Dn o el ratón Ts1Cje caracterizados por hiper- e hipoactividad respectivamente (13, 14). Hemos profundizado en el nivel de análisis de esta hiperactividad, empleando la prueba de análisis del patrón de natación. Cuando ésta se realizó en animales TgDyrk1A adultos, pudo detectarse un incremento en la actividad de tipo no lineal caracterizada por un mayor número de paradas y tras éstas, un comienzo más rápido y un mayor número de cambios de dirección, mostrando un patrón de natación más irregular y desorganizado que los controles. Este resultado sustenta la hipótesis de que TgDyrk1A podría presentar alteración a nivel de la corteza prefrontal afectando a la organización de la conducta motora, ya que no se trata únicamente de un incremento en actividad, sino de una actividad más errática, que posiblemente refleja alteraciones de atención y/o en la organización de la conducta emergente en nuestro modelo. Por tanto, la hiperactividad observada puede interpretarse como un fallo en el

control inhibitorio y como consecuencia un incremento en la impulsividad (Figura 5).

En relación con la posible patogenicidad de la sobreexpresión de Dyrk1A, las personas con SD muestran hiperactividad durante los primeros años de vida, que se ha propuesto que podría estar relacionada con una disfunción cortical, por lo que podemos proponer que el exceso de dosis de Dyrk1A podría contribuir a este rasgo fenotípico, ya que su sobreexpresión en un entorno disómico produce un fenotipo similar. Por otro lado, se estudió la influencia de la edad sobre la actividad locomotora en TgDyrk1A. Está descrito que con el envejecimiento se produce una disminución de la actividad locomotora del 50% con respecto a la edad adulta que algunos autores relacionan con una reducción de la densidad de receptores dopaminérgicos (15). Como se ha indicado anteriormente, el sistema dopaminérgico está íntimamente relacionado con el control de la actividad motora a través de la modulación de la actividad de los ganglios basales, por lo que este sistema podría estar alterado en nuestro modelo.

### Aspectos cognitivos y su deterioro con la edad

El envejecimiento patológico, propio de patologías demenciales, afecta de forma específica el almacén de memoria reciente que depende de la degeneración del sistema colinérgico del prosencéfalo basal.

### Memoria reciente

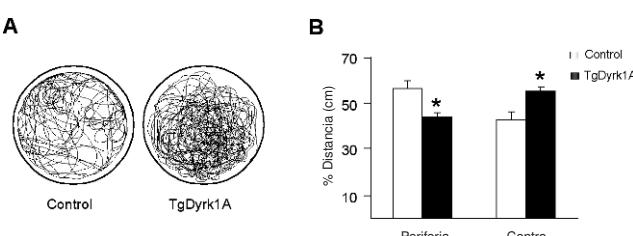
En la prueba de memoria reciente no se apreciaron diferencias importantes en el animal TgDyrk1A adulto. Sin embargo, los ratones TgDyrk1A viejos mostraron una peor retención tanto a corto (24 horas) como a medio (7 días) plazo comparados con los controles de la misma edad y durante la etapa adulta. Estos datos sugieren que la sobreexpresión de Dyrk1A podría estar afectando la memoria a corto y medio plazo favoreciendo el empeoramiento edad-dependiente de ésta, si bien no hemos podido determinar si las alteraciones son debidas a disfunciones durante la adquisición o la consolidación de la información. La pérdida de memoria reciente es la alteración cognitiva más precoz en la EA debido a que las vías colinérgicas procedentes del prosencéfalo basal que proyectan hacia corteza e hipocampo, circuitos neu-

rales implicados en el aprendizaje y memoria reciente, son los que presentan un deterioro más temprano y más intenso en esta patología. En el SD se observa también esta degeneración colinérgica, siendo de nuevo una característica neuropatológica común a ambas patologías. El hecho de que el fenotipo degenerativo esté presente en el animal transgénico, plantea la posibilidad de que Dyrk1A pudiera estar participando en la instauración temprana de la EA en el SD.

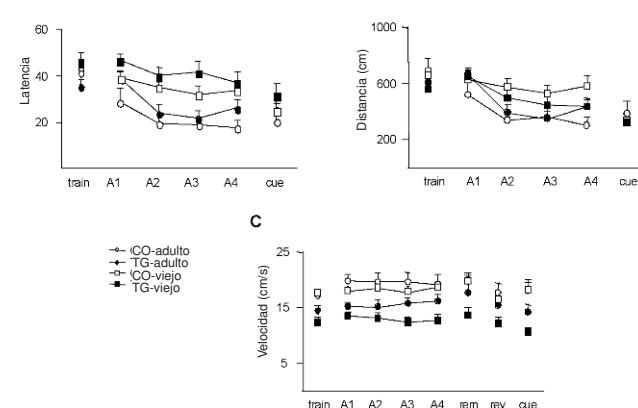
### Memoria visuo-espacial

Los pacientes con SD presentan dificultades en tareas que requieren memoria espacial, una ejecución deficiente en memoria a largo plazo y dificultades para aprender tareas nuevas (16). De hecho, en los pacientes con SD, aunque se ha descrito alteración de la memoria verbal a corto plazo, en lo que se refiere a la memoria reciente de tipo contextual, no existen afectaciones relevantes a no ser que aparezca un cuadro de demencia tipo EA (17). La exploración de las alteraciones en memoria visuo-espacial en diversos modelos trisómicos ha permitido seleccionar como genes candidatos aquellos comprendidos en la región cromosómica entre Sod1 y Znf295 (18). Dyrk1A está localizado en esta región y en varios modelos de sobreexpresión de Dyrk1A se han descrito diversas alteraciones en aprendizaje y memoria. En nuestros experimentos, el ratón TgDyrk1A adulto mostró un peor aprendizaje y memoria espacial (Figura 6).

En relación al envejecimiento, una de las estructuras más afectadas es el hipocampo, observándose un declive importante en las tareas de aprendizaje dependientes de esta estructura. Las alteraciones en la memoria visuo-espacial observadas en el SD con el envejecimiento no sufren un deterioro significativo a no ser que se instaure un cuadro de demencia (19). En nuestro modelo observamos un empeoramiento asociado a la edad en el aprendizaje más acusado en el ratón TgDyrk1A, si bien los dos genotipos mostraron deterioro del aprendizaje con el



**Figura 5.** Análisis del patrón de natación en TgDyrk1A. A) Trayectorias de natación representativas de ambos genotipos ilustrando como el animal TgDyrk1A presenta un patrón de natación más irregular predominante en la zona central. B) Porcentaje de la distancia recorrida en la zona central y periférica (controles n = 5; TgDyrk1A n = 9). Los datos se expresan como media ± E.E.M. Diferencias entre genotipos \*P < 0.05.



**Figura 6.** Efecto de la edad sobre la memoria visuo-espacial en el laberinto acuático en el ratón TgDyrk1A. Representación de A) la latencia de llegada a la plataforma, B) la distancia recorrida y C) la velocidad de natación en las sesiones de entrenamiento (train), adquisición (A1, A2, A3, A4), aprendizaje guiado (cue), retirada de la plataforma (rem) y cambio de posición de la plataforma (chi) en ambos genotipos a dos edades diferentes (control adulto n = 8; TgDyrk1A adulto n = 20; control viejo n = 18; TgDyrk1A viejo n = 11). Los datos se expresan como media ± E.E.M.

protocolo empleado. Finalmente la flexibilidad cognitiva, función afectada en el SD, al igual que en varios modelos trisómicos como Ts65Dn y Ts1Cje, y en el ratón YAC157F, no mostró déficit en el ratón TgDyrk1A en ninguna de las edades.

## Conclusión

En conclusión, nuestros resultados implican a Dyrk1A en el deterioro asociado a la edad de la función motora y la memoria reciente, posiblemente a través de la alteración en los sistemas de neurotransmisión dopaminafundamentalmente. A pesar de que las alteraciones descritas no están presentes en los dos modelos de expresión de *Dyrk1A*, posiblemente debido a acciones compensatorias, a un impacto diferencial de la procedencia genética, o a que las consecuencias de los cambios de dosis pueden ser diferentes si se trata de sobre-expresión o reducción de función, los resultados obtenidos implican a *Dyrk1A* en el control de diferentes funciones motoras como son el tono muscular, la coordinación motora, la marcha y la organización de las conductas motoras. Nuestros experimentos sugieren que los cambios de expresión de *Dyrk1A* provocarían modificaciones a largo término relacionadas con el proceso neurodegenerativo acentuándose los fenotipos alterados existentes previamente.

## Bibliografía

1. Oliver C, Crayton L, et al. A four year prospective study of age-related cognitive change in adults with Down's syndrome. *Psychol Med* 1998;28:1365-77.
2. Shultz J, Aman M, et al. Evaluation of screening tools for dementia in older adults with mental retardation. *Am J Ment Retard* 2004;109:98-110.
3. Dierssen M, Martínez de Lagran M. DYRK1A (dual-specificity tyrosine-phosphorylated and -regulated kinase 1A) : a gene with dosage effect during development and neurogenesis. *Scientific World Journal* 2006;6:1911-22.
4. Cuskelley M, Jobling A, et al. Down syndrome across the life span. London: Whurr, 2002.
5. Nadel L. (2003). Down's syndrome: a genetic disorder in biobehavioral perspective. *Genes Brain Behav* 2003;2:156-66.
6. Vázquez J. Educación física de base y actividades lúdicas. En: Flórez J, Troncoso MV. Síndrome de Down y educación. Barcelona: Ediciones Científicas y Técnicas, 2001.
7. Frith U, Frith CD. Specific motor disabilities in Down's syndrome. *J Child Psychol Psychiatry* 1974;15:293-301.
8. Altafaj X, Dierssen M et al. Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum Mol Genet* 2001;10:1915-23.
9. Parker AW, Bronks R et al. Walking patterns in Down's syndrome. *J Ment Defic Res* 1986;30:317-30.
10. Kubo M, Ulrich B. Coordination of pelvis-HAT (head, arms and trunk) in anterior-posterior and medio-lateral directions during treadmill gait in preadolescents with/without Down syndrome. *Gait Posture* 2006;23:512-8.
11. Hampton TG, Stasko MR, et al. Gait dynamics in trisomic mice: quantitative neurological traits of Down syndrome. *Physiol Behav* 2004;82:381-9.
12. Branchi I, Bichler Z, et al. Transgenic mouse in vivo library of human Down syndrome critical region 1: association between DYRK1A overexpression, brain development abnormalities, and cell cycle protein alteration. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63: 429-40.
13. Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, et al. A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. *Neurosci Lett* 1995;199:143-6.
14. Sago H, Carlson EJ, et al. Genetic dissection of region associated with behavioral abnormalities in mouse models for Down syndrome. *Pediatr Res* 2000;48:606-13.
15. Inoue A, Nakata Y. Strategy for modulation of central dopamine transmission based on the partial agonist concept in schizophrenia therapy. *Jpn J Pharmacol* 2001;86:376-80.
16. Vicari S. Motor development and neuropsychological patterns in persons with Down syndrome. *Behav Genet* 2006;36:355-64.
17. Jarrold C, AD Baddeley. Short-term memory in Down syndrome: applying the working memory model. *Downs Syndr Res Pract* 2001;7:17-23.
18. Roubertoux PL, Bichler Z, et al. Pre-weaning Sensorial and Motor Development in Mice Transpolygenic for the Critical Region of Trisomy 21. *Behav Genet* 2006;36: 377-86.
19. Nelson L, Johnson JK, et al. Learning and memory as a function of age in Down syndrome: a study using animal-based tasks. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29:443-53.