



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Terapia prenatal en el Síndrome de Down:

Inhibidores de factores de transcripción codificados en el cromosoma 21

Fetal therapy in Down Syndrome:

Inhibitors of transcription factors encoded on chromosome 21

Autora

Rocío Ciria Villar

Directora

Nuria Garrido Pérez

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Año 2022- 2023

ÍNDICE

TABLA DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT	4
1.- INTRODUCCIÓN	5
1.1 Síndrome de Down	5
1.2 Fosforilación oxidativa (OXPHOS)	6
1.3 Fosforilación oxidativa (OXPHOS) y síndrome de Down	8
1.4 Genes responsables del Síndrome de Down relacionados con la función OXPHOS. 10	
1.5 Posibles terapias dirigidas a mejorar la fosforilación oxidativa en el síndrome de Down.....	13
2.- OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	15
2.1 Objetivos	15
2.2 Justificación	15
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	15
4.- RESULTADOS	17
4.1 BACH 1	17
4.1.1 Relación con los genes mitocondriales de la ETC	17
4.1.2 Relación con el ciclo de Krebs o ciclo del ácido tricarboxílico (TCA).....	17
4.1.3 Respuesta antioxidante	17
4.1.4 Uso de hemina.....	19
4.1.5 Regulación de BACH1 mediante micro – ARN.....	22
4.1.6 Relación con HOIL – 1.....	22
4.1.7 Vía de respuesta a las proteínas desplegadas (UPR) y PERK.....	22
4.2 DYRK1A	23
4.2.1 Relación con la proteína tau y β- amiloide.....	23
4.2.2 Relación con cistationina – β- sintasa	24
4.2.3 Regulación por micro – ARN	24
4.2.4 Relación con Sinapsina 1 (SYN1).....	25
4.2.5 Localización subcelular.....	25
4.2.6 Participación en la neurogénesis cortical	25
4.2.7 Relación con la vía WNT/β cationina	26
4.2.8 Inhibidores de DYRK1A derivados de productos naturales.....	26
4.2.9 Inhibidores sintéticos de DYRK1A.....	29
5.- DISCUSIÓN	31
5.1 ¿Es éticamente deseable la terapia fetal en el síndrome de Down?	31

5.2 BACH 1	32
5.3 DYRK1A	35
6.- CONCLUSIONES	37
7.- BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXOS	41

TABLA DE ABREVIATURAS

ADNmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ADNn	Ácido desoxirribonucleico nuclear
ARE	Antioxidant response element (elemento de respuesta antioxidante)
ARNr	Ácidos ribonucleicos ribosómicos
ARNt	Ácidos ribonucleicos de transferencia
ATF6	Activating transcription factor 6 (factor de transcripción activador 6)
ATP	Adenosín trifosfato
<i>BACH1</i>	Gen del dominio BTB y del homólogo CNC 1
BDNF	Brain derived neurotrophic factor (factor neurotrófico derivado del cerebro)
βGPA	Ácido β-guanadino propiónico
BiP	Inmunoglobulina de unión a chaperona
bZip	Dominio con cremallera de leucina
CBS	Cistationina – β – sintetasa
ChIP	Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina
CI-CV	Complejos mitocondriales I - V
CLK1	Proteína quinasa de doble especificidad
CoQ10	Coenzima Q 10
CP	Cisteína - prolina
CREB	cAMP response element-binding (elemento de respuesta de proteína cAMP)
CSE	Cistationina – γ – liasa
Cyt C	Citocromo C
DANDY	Derivados de hidroxí 3,5,-diaril-7-azaindoles
DI	Discapacidad intelectual
DNP	2,4-dinitrofenol
DSF	Disulfiram
<i>DYRK1A</i>	Gen de la quinasa 1 regulada por la fosforilación de tirosina de doble especificidad
EGCG	Epigallocatequina-3-galato
EIF2α	Eukaryotic initiation factor-2 alfa (subunidad alfa del factor de iniciación eucariótico 2)
EO	Estrés oxidativo
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases (quinasas reguladas por señales extracelulares)
ETC	Electron transport chain (cadena de transporte de electrones)
FAD	Flavina
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
H₂S	Sulfuro de hidrógeno
HNE	4-hidroxinonenal
HO-1	Hemo–oxigenasa 1
HO•	Radical hidroxilo
Hsa21 o T21	Trisomía del cromosoma 21

IRE1	Quinasa que requiere inositol
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1 (proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch)
mCAT	Mitochondrial targeted catalase Catalasa dirigida a la mitocondria
3MST	3 – mercaptopiruvato sulfurtransferasa
NAD	Nicotinamide dinucleotide (dinucleótido de nicotinamida)
NFAT	Nuclear factor of activated T cells (factor nuclear de las células T activadas)
NPC	Neural progenitor cells (células progenitoras neuronales)
NQO1	NADPH quinona oxidorreductasa
NRF2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2)
NR1P1	Gen de la proteína que interactúa con el receptor nuclear 1
O₂⁻	Anión superóxido
OXPHOS	Sistema de fosforilación oxidativa
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PDK	Piruvato deshidrogenasa kinasa
PERK	Proteína quinasa del retículo endoplasmático similar al ARN
PFKL	Gen de la fosfofructoquinasa de tipo hepático
PGC-1α	Proliferador de peroxisomas 1-alfa
PKA	Proteína quinasa A
PKNOX1	Gen del factor de transcripción de homeodominio Prepl
RNS	Reactive nitrogen species (especies reactivas de nitrógeno)
ROS	Reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno)
SA	Succinilacetona
SD	Síndrome de Down
SIRT1	Sirtuina 1
SYN1	Sinapsina 1
TBHQ	Terbutilhiroquinona
TCA	Ciclo de ácido tricarboxílico
TFSD	Terapia fetal para el síndrome de Down
UPR	Unfolded protein response (respuesta a proteínas desplegadas)

RESUMEN

El síndrome de Down (SD) es el trastorno genético más común causante de discapacidad intelectual y se debe a la trisomía del cromosoma 21. La sobreexpresión de genes en este cromosoma es responsable de la patogenia del SD, ya que varios genes afectan al sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) en la etapa prenatal, produciendo un efecto negativo sobre la biogénesis mitocondrial y, por tanto, una disminución de la síntesis de ATP necesaria para la neurogénesis.

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado ha sido revisar la bibliografía actual disponible acerca de las diferentes estrategias prenatales para el tratamiento del síndrome de Down destinadas a inhibir la sobreexpresión de *BACH1* y *DYRK1A*. Se ha obtenido la información mediante ecuaciones de búsqueda en la base de datos online de PubMed.

La sobreexpresión de *BACH1* altera la relación BACH1/NRF2 en el núcleo disminuyendo la expresión de genes de respuesta antioxidantes y acumulando estrés oxidativo. Se ha encontrado que el éster fenólico del ácido cafeico (CAPE) y su análogo sintético VP961, promueven la translocación nuclear de NRF2 suprimiendo su ubiquitinación. Los niveles altos de hemo y de cadmio, regulan la localización citoplasmática de BACH1 y posterior degradación, aumentando los niveles de hemo-oxigenasa 1. Esto se consigue mediante el tratamiento con hemina.

La sobreexpresión de *DYRK1A* hiperfosforila la proteína tau e incrementa los niveles de 3R-tau contribuyendo a la neurodegeneración. También produce un alargamiento de la fase G1 del ciclo celular favoreciendo una diferenciación prematura de las células. Se ha demostrado la eficacia de diferentes inhibidores de DYRK1A, entre ellos, epigallocatequina-3-galato (EGCG), leucettina 41 y derivados de hidroxil-3,5,-diaril-7-azaindoles (DANDY), en restaurar los déficits cognitivos y los fenotipos craneofaciales en el SD. CX-4945 y INDY normalizan la fosforilación de la proteína tau.

Los principales retos a los que se enfrentan las estrategias de tratamiento prenatal son la teratogenicidad, la toxicidad y las consideraciones éticas.

Palabras clave: síndrome de Down, fosforilación oxidativa, biogénesis mitocondrial, terapia prenatal, *BACH1*, NRF2, hemina, *DYRK1A*, EGCG.

ABSTRACT

Down syndrome (DS) is the most common genetic disorder causing intellectual disability and it is due to the trisomy of chromosome 21. The overexpression of genes on this chromosome is responsible for the pathogenesis of DS, as several genes affect the oxidative phosphorylation system (OXPHOS) in the prenatal stage, producing a negative effect on mitochondrial biogenesis and, therefore, a decrease in ATP synthesis required for neurogenesis.

The aim of this project was to review current literature about different strategies for the treatment of Down syndrome destined to inhibit the overexpression of *BACH1* and *DYRK1A* at the prenatal stage. The information was obtained through search equations in the PubMed online database.

The overexpression of *BACH1* disrupts the BACH1/NRF2 ratio in the nucleus by decreasing the expression of antioxidant genes and accumulating oxidative stress. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its synthetic analogue VP961 have been found to promote the nuclear translocation of NRF2 and suppress its ubiquitination. High levels of heme and cadmium regulate the cytoplasmic localization of BACH1 and subsequent degradation, increasing levels of heme-oxygenase 1. This is achieved by treatment with hemin.

The overexpression of *DYRK1A* hyperphosphorylates tau protein and increases 3R-tau levels contributing to neurodegeneration. It also causes a lengthening of the G1 phase of the cell cycle, assisting premature cell differentiation. The efficacy of different DYRK1A inhibitors, including epigallocatechin-3-gallate (EGCG), leucettin 41 and hydroxy derivatives of 3,5-diaryl-7-azaindoles (DANDY), has been proved in restoring cognitive deficits and craniofacial phenotypes in DS. CX-4945 and INDY normalize the phosphorylation of tau protein.

The main challenges of fetal therapies are teratogenicity, toxicity and ethical considerations.

Key words: Down syndrome, oxidative phosphorylation, mitochondrial biogenesis, fetal therapy, *BACH1*, NRF2, hemin, *DYRK1A*, EGCG.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 Síndrome de Down

El **síndrome de Down** (SD) es el trastorno genético del desarrollo más **común** en seres humanos, afecta a **1 de cada 800** recién nacidos al año, alcanzando una prevalencia superior a los **5 millones** de personas en todo el mundo. A pesar de los importantes avances en el cribado prenatal no invasivo, la **prevalencia** del síndrome de Down se ha mantenido **estable** durante los últimos 30 años, debido fundamentalmente al aumento de **edad** de la madre gestante.¹

El SD es la causa más frecuente de **discapacidad intelectual (DI)** y se debe a una trisomía del cromosoma 21. Ocurre como un error de segregación aleatoria durante la **meiosis** en el óvulo o el espermatozoide en desarrollo, que conduce a una **tercera copia parcial o completa** del **cromosoma 21** en todas las células somáticas del embrión (Hsa21 o T21).^{1,2}

La **sobreexpresión de genes** en el cromosoma 21 es responsable de la patogenia de las **características fenotípicas** del SD, ya sea de manera directa o indirecta, ya que muchos genes Hsa21 pueden afectar a la expresión de otros genes mapeados en diferentes cromosomas. Se han identificado 222 genes codificantes de proteínas localizados en el cromosoma 21 y muchos de estos genes están involucrados en la función mitocondrial y la producción de energía a través del **sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS)**, pudiendo originar un efecto **negativo** sobre la **biogénesis mitocondrial** y una **disminución** en la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) necesaria para la **neurogénesis**.^{2,3}

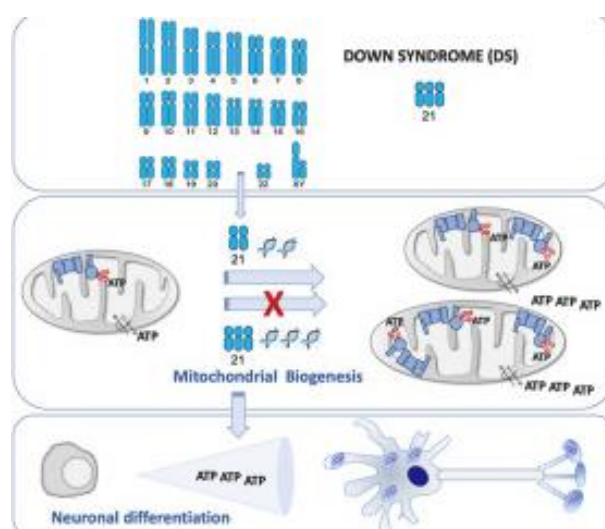


Figura 1. Síndrome de Down y neurogénesis²

La **neurogénesis** es el proceso que facilita la **formación de nuevos circuitos neuronales** en el cerebro adulto mediante el suministro de nuevas neuronas a los circuitos existentes en respuesta al aprendizaje, al tratamiento farmacológico, a la lesión cerebral traumática y a otros estímulos.⁴

El SD tiene un fenotipo complejo, asociado a características constantes como el **retraso mental**, los **rasgos dismórficos** (braquicefalia, pliegue epicántico y lengua protuida) y la **hipotonía**; y a otras condiciones médicas variables como problemas visuales y auditivos, **defectos cardíacos** (comunicación intraauricular), anomalías gastrointestinales, convulsiones, y **susceptibilidad a la enfermedad de Alzheimer**, la diabetes mellitus tipo II, la obesidad y diversos trastornos inmunológicos.^{1,3,5}

El cerebro de las personas con SD muestra una **disminución** en las capacidades de **proliferación y diferenciación neuronal** de las células progenitoras neuronales (NPC) y **un aumento de la muerte celular** desde el período **fetal y neonatal**, acompañado de alteraciones metabólicas. Además, los estudios muestran una **superficie cortical reducida**, un volumen cerebral más pequeño y una **neurogénesis deficiente**. Todo ello se traduce en un **envejecimiento prematuro y un riesgo de demencia precoz**.²

1.2 Fosforilación oxidativa (OXPHOS)

Las **mitocondrias** son orgánulos de doble membrana cuya función principal es la **producción de energía** celular en forma de **ATP** utilizando **O₂ y sustratos metabólicos**, a través del sistema **OXPHOS** ubicado en las crestas mitocondriales. El número de mitocondrias por célula varía de varios cientos a varios miles, según el tipo de célula, y, además de la producción de ATP, cumplen una amplia gama de funciones que incluyen, entre otras, la biosíntesis de aminoácidos, la **gestión de especies reactivas de oxígeno (ROS)**, y el control de procesos fundamentales en la **neuroplasticidad** como la liberación de neurotransmisores y la remodelación dendrítica.⁵

El sistema OXPHOS consta de la **cadena de transporte de electrones (ETC)** de la membrana interna mitocondrial y la **ATP sintetasa (CV)**. ETC incluye los **complejos respiratorios I a IV** (CI – CIV), el **citocromo C** (Cyt c) y la **coenzima Q10** (CoQ10).²

La mayoría de las **proteínas mitocondriales**, incluidas todas las proteínas necesarias para la replicación, transcripción y traducción del ADN mitocondrial (ADNmt); proteínas de ensamblaje de complejos OXPHOS; y la mayoría de las subunidades estructurales de los complejos OXPHOS, están **codificadas** en los **chromosomas nucleares** (ADNn). Las proteínas mitocondriales median procesos como la regulación de la **homeostasis iónica**, las respuestas al **estrés**, la **supervivencia** celular y la transducción de señales. Sin embargo, el **ADNmt** contiene 37 genes que codifican para **13 proteínas** que forman parte del sistema **OXPHOS**, además de los 22 ARN de transferencia (ARNt) y los 2 ARN ribosómicos (ARNr) necesarios para su traducción en el interior de la mitocondria.^{2,5}

La biogénesis del sistema OXPHOS está mediada por el **receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas 1-alfa** (PGC-1 α o PPARGC1A). Tras la fosforilación por la **proteína quinasa A** (PKA), el **elemento de respuesta de proteína cAMP** (CREB) activa la expresión de PGC-1 α , que a su vez induce la expresión de factores de transcripción nucleares y mitocondriales. Además del núcleo, también se ha encontrado **CREB** dentro de la **matriz mitocondrial**, donde se une al bucle D del ADN mitocondrial e induce la expresión de los genes mitocondriales.⁶

El **complejo I (NADH deshidrogenasa)** cataliza la **oxidación** del dinucleótido de nicotinamida (**NADH**) a **NAD⁺**, y transfiere los electrones a la **coQ10** (ubiquinona). La deficiencia genética del complejo I es la más prevalente de las enfermedades mitocondriales neurológicas primarias. El **complejo II (succinato deshidrogenasa)** tiene un cofactor de flavina (**FAD**) unido covalentemente y acopla la **oxidación** del succinato a la **reducción de la coQ10**.^{5,6}

La **coQ10** es la encargada de trasladar **electrones** de los complejos I y II al complejo III, que pasa los electrones al **citocromo C**, una proteína móvil que transfiere electrones al **CIV** (citocromo C oxidasa) para la **reducción final de O₂ a H₂O**.⁵

El **flujo de electrones** a través del ETC determina el **consumo de oxígeno** y el **potencial** de la membrana interna mitocondrial generado por el **bombeo de protones** desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana mediante los complejos CI, CIII y CIV, creándose un **potencial de difusión de protones** que impulsa la actividad del **CV**. Este complejo permite la conversión de **energía de potencial electroquímico** en energía química en forma de **ATP**.^{2,5}

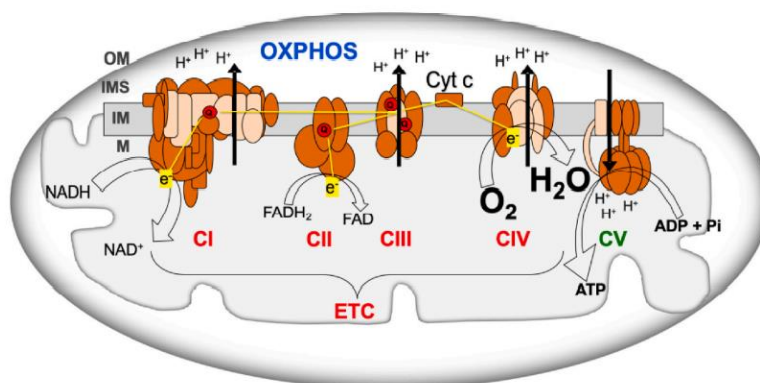


Figura 2. Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Adenosín difosfato (ADP); adenosín trifosfato (ATP); citocromo C (Cyt C); complejos respiratorios (CI – CIV); CV (ATP sintetasa); cadena de transporte de electrones (ETC), e⁻ (electrones); dinucleótido de flavina y adenina reducido (FADH₂/FAD); agua (H₂O); H⁺ (protones), membrana mitocondrial interna (IM); espacio intermembrana (IMS); matriz mitocondrial (M); dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido y oxidado (NADH/NAD⁺); membrana mitocondrial externa (OM); oxígeno (O₂); fosfato (Pi); coenzima Q (Q). Los colores marrón y rosa se utilizan para las subunidades codificadas por el ADNn y el ADNmt, respectivamente. Las líneas amarillas indican el flujo de electrones. Las flechas negras representan el bombeo de protones.²

El **ATP** generado gracias a OXPHOS es esencial para todos los procesos biológicos, especialmente en el **SNC** para la **excitabilidad y supervivencia** de las neuronas, y para la **fosforilación** de proteínas que median la **señalización sináptica** y los cambios a largo plazo relacionados en la **estructura y función neuronal** (ensamblaje de microfilamentos de actina, desarrollo/formación de complejos presinápticos, generación del potencial de membrana y endocitosis).^{2,5}

Por lo tanto, el sistema OXPHOS es fundamental para el desarrollo del **cerebro** y el **proceso neurogénico** durante el **desarrollo prenatal**, ya que mutaciones patológicas en los genes relacionados con él afectan a la **diferenciación neuronal**.⁵

1.3 Fosforilación oxidativa (OXPHOS) y síndrome de Down

La **disfunción prenatal temprana del sistema OXPHOS**, una **reducción** en la producción de **energía mitocondrial** y una **menor función mitocondrial** en diversos tejidos o tipos celulares a cualquier edad, son mecanismos patológicos clave en la **DI**. Algunas funciones mitocondriales como la capacidad respiratoria, la generación de potencial de membrana y la síntesis de ATP están disminuidas en las células de pacientes con SD como consecuencia de un déficit en la maquinaria OXPHOS. Sin embargo, hay un **aumento de la concentración de calcio intramitocondrial** y de la **producción de ROS** que conduce a **estrés oxidativo**.^{2,3,5}

El **complejo I** es el sitio de **entrada** de **electrones** de los nutrientes en la ETC, regula la producción de **ATP mitocondrial** y es el principal sitio de **producción de ROS**. Dado que la actividad del complejo I, así como la actividad de las otras proteínas involucradas en OXPHOS, están controladas por la **fosforregulación dependiente de AMPc/PKA**, se deduce que la vía de señalización **AMPc/PKA regula** la capacidad funcional de **OXPHOS** y el **equilibrio de radicales libres de oxígeno** en las mitocondrias. En consecuencia, una **alteración** primaria de esta vía podría dar lugar a un **déficit en la producción** de energía mitocondrial. Los **defectos del metabolismo energético** de la mitocondria se relacionan con la **demencia**. En particular, un déficit de la actividad del **complejo I** se produce en el **SD**, el síndrome de Rett, el síndrome X frágil y el autismo, así como en varios trastornos neurológicos humanos, incluidas las enfermedades mitocondriales primarias, las **enfermedades de Parkinson y de Alzheimer**.⁵

Se han creado varios **modelos de ratones** que portan una **trisomía** de un solo gen (modelos monogénicos) o de regiones cromosómicas (modelos de trisomía parcial) y ofrecen sistemas **fiables** para estudiar el **fenotipo** del SD y desarrollar **terapias eficaces**, siempre que se tengan en cuenta unas consideraciones:

- Un buen modelo debe portar **genes** que sean exclusivamente **ortólogos al Hsa21 humano**.
- El fenotipo del modelo de ratón elegido debe **imitar el fenotipo humano** tanto como sea posible.
- Al igual que en la condición humana, la **madre no debe portar el segmento trisómico** para evitar cualquier factor de confusión de la trisomía materna en el entorno fetal en el útero.
- El mejor modelo debe tener un buen **rendimiento reproductivo, baja mortalidad perinatal y costos** de producción **razonables**.

De los modelos de ratón con SD disponibles, los más utilizados son las cepas de trisomía parcial: **MMU16 Ts1YeY, Ts65Dn, Ts1Cje y Ts1Rhr**.⁷

Tanto los ratones **Ts65Dn** como los **Ts1Cje** muestran un **retraso del crecimiento** en la pared neocortical debido a la **detención del ciclo celular**, lo que da como resultado una **diferenciación neuronal comprometida** durante la embriogénesis. Desde el punto de vista del **comportamiento**, los ratones modelo con SD muestran características relevantes para el SD humano, incluidos los **déficits en el aprendizaje y la memoria**.⁴

El estudio en **células humanas** obtenidas de pacientes con SD muestra una **reducción de los niveles de ARNm** de varias subunidades de los **complejos del sistema OXPHOS** en el cerebro y en fibroblastos. En cultivos primarios de **fibroblastos fetales humanos TS21**, se observó una **alteración en la morfología mitocondrial** con crestas más cortas, concéntricas o dañadas.^{2,3}

La **regulación negativa** de genes para todos los **complejos OXPHOS** también se encontró en el corazón, fibroblastos y amniocitos de **fetos con SD de 8 a 22 semanas**, lo que se traduce en una reducción en la producción de energía y en la función mitocondrial. Esta disminución en los niveles de ARNm estuvo acompañada por una **menor transcripción de genes** codificados en el ADNmt y por una **menor cantidad de ADNmt** en el cerebro y cerebelo de fetos con **SD de 14 a 19 semanas**. Además, se comprobó una **disminución de coenzima Q** en linfocitos, plaquetas y plasma de individuos con SD, lo que implica que la **síntesis de novo de nucleótidos de pirimidina** estaba **alterada**.²

El denominador común de la mayoría de las alteraciones en los mecanismos mitocondriales es **PGC-1 α o PPARGC1A**, un modulador clave de la **biogénesis mitocondrial** que está significativamente **regulado a la baja** en las muestras de **fibroblastos** fetales con SD. La función respiratoria está mediada por la interacción con socios transcripcionales, como **NRF1, ERR α , PPAR** y **YY1** que modulan la expresión de la mayoría de los **genes mitocondriales codificados en el núcleo (NEMG)**.³

La **baja tasa de consumo de oxígeno basal** y la **tasa de acidificación extracelular** en células de individuos con SD, indica tanto una **respiración mitocondrial alterada** (función bioenergética aeróbica) como una **glucólisis suprimida** (función bioenergética anaeróbica).¹

Según la “**hipótesis de Kamoun**”, otro mecanismo implicado en la patogenia de los déficits neurológicos y metabólicos del SD es la **sobreproducción de sulfuro de hidrógeno (H₂S)** generada por la **cistationina – β – sintetasa (CBS)**, una enzima localizada en el cromosoma 21, la **cistationina – γ – liasa (CSE)** y la **3 – mercaptopiruvato sulfurtransferasa (3MST)**. El H₂S suele tener efectos en forma de **campana**: en concentraciones más **bajas, estimula la bioenergética celular**, mientras que, en concentraciones **toxicológicas**, suprime la función mitocondrial a través de la **inhibición del CIV**.^{1,8}

Se ha demostrado que los **fibroblastos** en pacientes con SD contienen unos **niveles de 3MST** mitocondrial marcadamente **elevados**, y que la **inhibición de 3MST** mejora la tasa de **proliferación celular**.^{1,8}

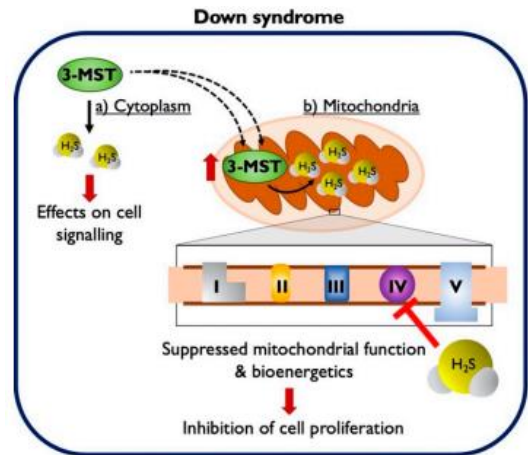


Figura 3. La proteína 3-MST está regulada al alza en el síndrome de Down y contribuye a la disfunción celular. El exceso de 3-MST se transporta a la mitocondria. La subsiguiente sobreproducción de H₂S suprime el transporte de electrones mitocondriales y provoca un déficit bioenergético celular, que se evidencia, entre otras respuestas, por una supresión de la tasa de proliferación celular.¹

1.4 Genes responsables del Síndrome de Down relacionados con la función OXPHOS

La **sobreexpresión de genes** que codifican enzimas específicas de **Hsa21** afecta a múltiples vías metabólicas, siendo responsable de la **patogenia del SD**.^{2,3}

La **familia PPAR** de genes de **receptores nucleares** consta de tres isoformas: **PPAR- α** , **PPAR- β/δ** , y **PPAR- γ** expresados en diferentes tejidos, que inducen la expresión génica a través de la interacción específica con factores de transcripción. **PPAR- α** coopera con **PGC-1 α** en el control transcripcional de genes nucleares que codifican **enzimas de oxidación de ácidos grasos mitocondriales**. Además de sus efectos sobre el metabolismo de los lípidos, **PPAR- γ** y **PPAR- δ** **promueven la biogénesis mitocondrial** de una manera específica. La **reducción** de la **actividad** de **PGC-1 α** , observada en muestras de SD, afectaría a la **eficiencia transcripcional** de los genes controlados por PPAR.^{3,9}

La **biogénesis mitocondrial** se define como el proceso por el que las células **incrementan** el **número de mitocondrias** mediante el crecimiento y división de las mitocondrias preexistentes. Es necesario que las mitocondrias, además de crecer, se dividan durante el desarrollo neural. Los genes localizados en el cromosoma 21 que tienen un **efecto negativo** sobre la biogénesis mitocondrial y se encuentran **sobreexpresados en SD** son: **BACH1**, **DYRK1A**, **NR1P1**, **PFKL**, **PKNOX1** y **RCAN1**.²

BACH1

El **gen del dominio BTB y del homólogo CNC 1 (BACH1)** está localizado en el cromosoma 21 en la banda cromosómica **21q21.3**.²

BACH1 es un factor de transcripción de unión al grupo **hemo** que se une a la **región promotora** de genes que codifican componentes de la ETC y regula **negativamente** su transcripción,

reduciendo así la respiración mitocondrial. También es un **represor** de genes inducidos por el **factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (NRF2 o NFE2L2)**, que desplaza a BACH1 y regula de forma **positiva** muchos genes. Por tanto, regula **negativamente la biogénesis mitocondrial**.²

DYRK1A

El gen *DYRK1A* es el gen de la **quinasa 1 regulada por la fosforilación de tirosina de doble especificidad** que se encuentra localizado en el cromosoma 21 en la posición **21q22.13**.²

DYRK1A se ha propuesto como responsable de varios rasgos fenotípicos del SD ya que está involucrada en múltiples vías celulares que incluyen la **diferenciación neuronal y el metabolismo celular**. Actúa catalizando su **autofosforilación** en residuos de serina/treonina y tirosina.³

La **sobreexpresión de DYRK1A reduce la actividad del factor nuclear** de las células T activadas (NFAT), el cual actúa de forma positiva sobre el promotor del gen coactivador del **PGC-1 α o PPARGC1A**, por lo que niveles elevados podrían **limitar la biogénesis mitocondrial**.²

NR1P1

El gen *NR1P1*, de la proteína que interactúa con el **receptor nuclear 1** se localiza en el cromosoma 21 en la posición **21q11.2-q21.1**. Codifica una proteína localizada en el núcleo que interactúa específicamente con el **dominio de activación dependiente de hormonas AF2 de los receptores nucleares**.²

La sobreexpresión de NR1P1 en fibroblastos fetales con SD **inhibe PPARGC1A y reduce los niveles de ARNm** de muchos genes relacionados con **OXPHOS** afectando negativamente, por tanto, a la **biogénesis mitocondrial** en diferentes células y tejidos.^{2,3,5}

PFKL

El gen de la **fosfofructoquinasa de tipo hepático (PFKL)**, se encuentra localizado en el cromosoma 21 en la posición **21q22.3**.²

PFKL cataliza la **conversión de D-fructosa 6-fosfato en D-fructosa 1,6-bisfosfato**. Este gen desempeña un papel fundamental en la regulación del **equilibrio** metabólico entre la **glucólisis y la función OXPHOS**.²

La sobreexpresión de *PFKL* regula **negativamente la neurogénesis** de las células madre neurales, ya que inhibe la expresión de factores transcripcionales pro-neurales impidiendo su **diferenciación neuronal**.²

PKNOX1

El gen *PKNOX1* está localizado en el cromosoma 21 en la posición **21q22.3**. Codifica el factor de transcripción de **homeodominio Prep1** que pertenece a la familia de las **proteínas TALE** (extensión del bucle de tres aminoácidos).²

La sobreexpresión de este gen se relaciona con un efecto **negativo** sobre la **biogénesis mitocondrial** y el sistema **OXPHOS** dado que su **supresión** específica en el músculo conduce a una mayor expresión de las subunidades **ETC**, una mayor **actividad enzimática** y una alta expresión de **PPARGC1A**.^{2,3}

RCAN1

El gen *RCAN1* también conocido como **calcipresina**, es el regulador de la **calcineurina 1** y está localizado en el cromosoma 21 en la región **21q22.12**. La proteína codificada por este gen interactúa con la calcineurina A e **inhibe la vía de transducción de señales** dependiente de calcineurina, que puede afectar al **desarrollo del sistema nervioso central**.^{2,3}

La sobreexpresión de *RCAN1* se ha encontrado en el cerebro de pacientes con SD y con enfermedad de Alzheimer. **Reduce**, al igual que DYRK1A, la **actividad de NFAT**. Por tanto, se ha relacionado la sobreexpresión de *RCAN1* con el **estrés oxidativo**, la **disfunción mitocondrial** y la **sobrecarga de calcio**.³

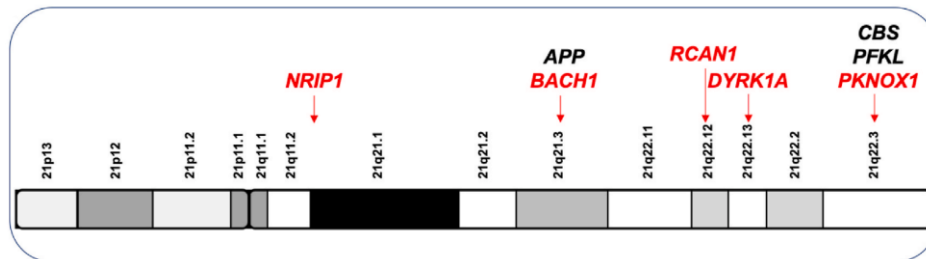


Figura 4. Genes del cromosoma 21 que reprimen la biogénesis mitocondrial. Ubicación en el cromosoma 21 de genes que afectan la función de fosforilación oxidativa. Algunos de ellos, indirectamente, a través de un efecto negativo sobre la biogénesis mitocondrial (color rojo).²

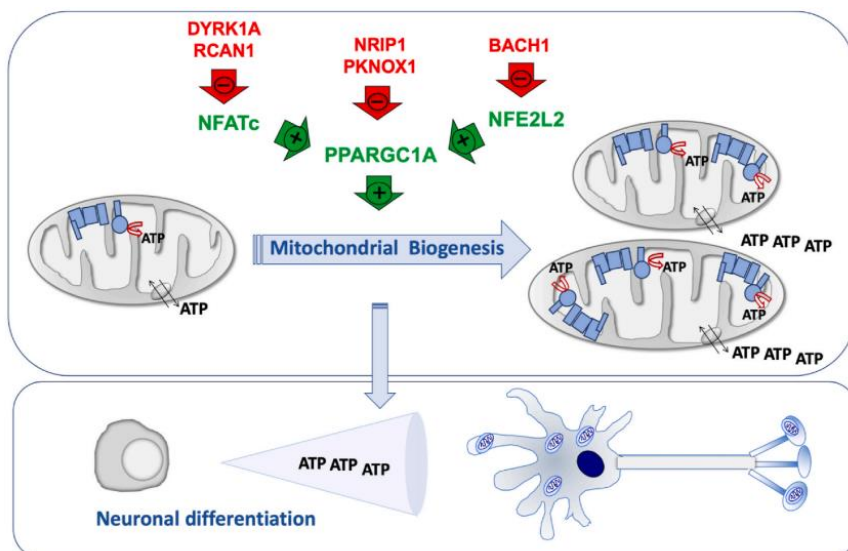


Figura 5. Proteínas codificadas en el cromosoma 21 que bloquean la biogénesis mitocondrial. La biogénesis mitocondrial conduce a un aumento general en la síntesis de ATP. La neurogénesis requiere una gran cantidad de energía.²

Como se ha ido señalando, estos genes localizados en el cromosoma 21 **regulan negativamente** la expresión del factor **PPARGC1A** directa o indirectamente, reduciendo su actividad y provocando una **disminución de la biogénesis mitocondrial** que conlleva una **alteración del sistema OXPHOS**. De todos ellos, este trabajo se centrará en: *BACH1* y *DYRK1A* y sus posibles inhibidores.

1.5 Posibles terapias dirigidas a mejorar la fosforilación oxidativa en el síndrome de Down

Por un lado, se ha propuesto como posible terapia en pacientes con SD la **activación de PGC-1 α** con fármacos como **resveratrol**, **pioglitazona**, **metformina**, **ácido β -guanadino propiónico (β GPA)** o **2,4-dinitrofenol (DNP)**; por otro lado, se plantea la **inhibición de genes sobreexpresados** que afectan **negativamente** a la **biogénesis mitocondrial**. Los objetivos farmacológicos incluyen la vía de la **colina**, los receptores **GABA** y **NMDA**, **el estrés oxidativo** y las vías involucradas en el desarrollo y la **neurogénesis**.^{2,3,7}

También deben considerarse para el tratamiento de enfermedades neurológicas ligadas a la DI, los compuestos capaces de actuar sobre la **activación de la producción de AMPc** por la adenilil ciclasa (moléculas adrenorreceptoras) y/o sobre la **inhibición de su degradación** por la fosfodiesterasa (**rolipram**).⁵

Hasta la fecha, se han probado **nueve moléculas** en ensayos clínicos con **adultos humanos**, incluyendo: los inhibidores de la acetilcolinesterasa **donepezil** y **rivastigmina**, el potenciador de la ruta de la colina, **piracetam**, un antagonista del receptor de glutamato (NMDAR), **memantina**, **hormona de crecimiento humano**, **ácido folínico**, **vitamina E**, **epigallocatequina-3-galato (EGCG)** y un ácido gamma butírico antagonista del receptor conocido como **RG1662**.¹⁰

Los **hábitos de vida y las medidas nutricionales** pueden contribuir a mantener una **cascada de AMPc 'activa'**, como el **control de la ingesta calórica** y la **calidad de las grasas** de la dieta, con preferencia por los aceites vegetales, especialmente el **aceite de oliva** por su contenido en ácido oleico monoinsaturado y polifenoles. Esto promueve la **renovación de los complejos de OXPHOS**, en particular el CI, y **evita un aumento de ROS**.⁶

La **dieta cetogénica** se ha propuesto como una posible opción terapéutica para las personas con SD por sus efectos sobre el **desarrollo cerebral** durante los **períodos prenatal y posnatal** temprano, aumentando los niveles de ARNm de los genes implicados en la **biogénesis mitocondrial** y de **PPARGC1A**.²

La **colina**, junto con el **trifosfato de citidina**, son necesarios para la **síntesis de fosfolípidos** y el **desarrollo del cerebro**. Su administración **prenatal** ha demostrado tener efectos beneficiosos sobre la **neurogénesis**, el **desempeño conductual**, la **memoria espacial** y la **atención visual** en **adultos**.^{2,7}

El tratamiento con **melatonina mejoró el aprendizaje y la memoria, redujo la peroxidación de lípidos** y normalizó el equilibrio excitatorio/inhibitorio mediante el **aumento de densidad y actividad de las neuronas glutamatérgicas**.⁷

Teniendo en cuenta las múltiples vías potenciales para el tratamiento del SD, y dado que la disfunción de OXPHOS es especialmente crítica en el período prenatal, este trabajo se centra en las **estrategias prenatales** destinadas a **inhibir** la **sobreexpresión** de varios genes codificados en el cromosoma 21 revirtiendo así su efecto en la **biogénesis mitocondrial**.

2.- OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

2.1 Objetivos

El objetivo de este trabajo es revisar la bibliografía actual disponible acerca de las diferentes **posibilidades de tratamiento del síndrome de Down**, centrándose en las terapias **prenatales** dirigidas a corregir los **defectos de la fosforilación oxidativa** responsables de la patogenia de la enfermedad.

2.2 Justificación

El síndrome de Down afecta a más de **5 millones de personas** en todo el mundo. Durante los últimos 10 años se ha producido un aumento importante en los esfuerzos de investigación enfocados en **intervenciones terapéuticas para mejorar el aprendizaje y la memoria** de los pacientes con SD.

Algunos resultados obtenidos con la terapia prenatal en **modelos animales** animan a dedicar más tiempo, esfuerzo y recursos en este campo. Debemos disponer de **pruebas experimentales** convincentes basadas en **estudios con células y animales** que garanticen la **seguridad** y la **eficacia** de la terapia antes de plantear **ensayos clínicos en embarazadas**. Por este motivo se ha decidido llevar a cabo esta revisión bibliográfica.

Entre todas las posibles terapias dirigidas a **mejorar la fosforilación oxidativa** en el SD, las que han conseguido resultados más prometedores son las actuaciones sobre de los **factores de transcripción codificados en el cromosoma 21**. Es por ello, que este Trabajo Fin de Grado centra la parte de resultados en esta vía de acción con el fin de poder realizar futuras pruebas experimentales.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

- **Diseño:** se ha realizado una **revisión bibliográfica** de la literatura científica disponible sobre la fosforilación oxidativa en el SD, el papel de los genes sobreexpresados en el cromosoma 21 y las posibles estrategias terapéuticas con diferentes vías de actuación.

- **Estrategia de búsqueda y extracción de datos:** la información se ha obtenido creando ecuaciones de búsqueda en la base de datos online de **PubMed**. Primero se establecieron los descriptores de búsqueda en la página de **descriptores de ciencias de la salud DeCS**, posteriormente se introdujeron en el buscador **MeSH** de PubMed con distintas combinaciones:

➔ **(Oxidative Phosphorylation[MeSH Terms]) AND (down syndrome[MeSH Terms])**

➔ 10 artículos, de los cuales en base al resumen se seleccionaron 7.

➔ **("Fetal Therapies"[Mesh]) AND "Down Syndrome"[Mesh]** ➔ 18 artículos, de los fueron incluidos 3.

- ➔ "Down Syndrome"[Mesh]) AND "BACH1 protein, human" [Supplementary Concept] → 7 artículos, de los cuales en base al resumen se seleccionaron 2.
- ➔ ("Hemin"[Mesh]) AND "BACH1 protein, human" [Supplementary Concept] → 7 artículos, de los cuales en base al resumen se seleccionaron 3.
- ➔ (("NF-E2-Related Factor 2"[Mesh]) AND "Down Syndrome"[Mesh]) → 3 artículos que por su relevancia fueron incluidos en su totalidad.
- ➔ ("Hemin"[Mesh]) AND "NFE2L2 protein, human" [Supplementary Concept] → 17 artículos, de los cuales en base al resumen sólo se seleccionó 1 artículo que guardaba relación con el tema del trabajo.
- ➔ ("Dyrk kinase" [Supplementary Concept]) AND "Down Syndrome"[Mesh] → 164 artículos, tras aplicar el filtro de los últimos 10 años, se redujeron a 81 artículos, de los cuales en base al resumen se seleccionaron 20 artículos, y tras su lectura completa 18.
- ➔ ("Dyrk kinase" [Supplementary Concept]) AND "epigallocatechin gallate" [Supplementary Concept] → 15 artículos, de los cuales en base al resumen se seleccionaron 5.

A partir de artículos encontrados en un primer momento con la búsqueda, también se han incluido **artículos similares** ofrecidos por PubMed y se ha llegado a otros artículos a través de las **referencias bibliográficas** de los primeros.

- **Criterios de inclusión y exclusión:** se priorizaron los ensayos centrados en **prototipos con SD**, sin embargo, por la escasez de estos, se revisaron también aquellos realizados sobre **estirpes celulares cancerosas** que presentaban la misma sobreexpresión génica. No se ha aplicado **ningún filtro** en las estrategias de búsquedas referentes a BACH1, sin embargo, en una de las ecuaciones de DYRK1A, dado el volumen de artículos encontrados, la revisión se limitó a los de los últimos 10 años.

- **Análisis de datos:** la información obtenida se ha estructurado para proporcionar una perspectiva diferente del síndrome de Down como **disfunción mitocondrial**. Se abordan las principales **líneas de investigación de la terapia prenatal** y sus **proyecciones futuras** para revertir y/o prevenir el deterioro cognitivo en el SD. Se ha tenido en cuenta que los ensayos revisados incluyeran un **grupo control como criterio de validez externa**.

4.- RESULTADOS

4.1 BACH 1

4.1.1 Relación con los genes mitocondriales de la ETC

Se han identificado **6 genes mitocondriales** (*ATP5D*, *COX15*, *UQCRC1*, *ATP5J*, *SLC25A22* y *TIMM8B*) como **sitios de unión** potenciales a **BACH1** mediante **ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)** en dos líneas celulares humanas de cáncer de mama triple negativo (BM1 y MB436) que sobreexpresan *BACH1* igual que las células de los individuos con SD. Utilizando **células deficientes en *BACH1* (MB468)** como controles, se ha observado la unión de BACH1 a las **regiones promotoras de los genes ETC**, demostrándose la función de BACH1 como **supresor de la transcripción** de los genes de la ETC.¹¹

4.1.2 Relación con el ciclo de Krebs o ciclo del ácido tricarboxílico (TCA)

BACH1 suprime la actividad de la **piruvato deshidrogenasa (PDH)**, una enzima clave que convierte el piruvato en **acetil-CoA** para el **ciclo del ácido cítrico (TCA)**, a través de la activación transcripcional de la **piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK)**, que **fosforila** la PDH en Ser293. Los ensayos de ChIP

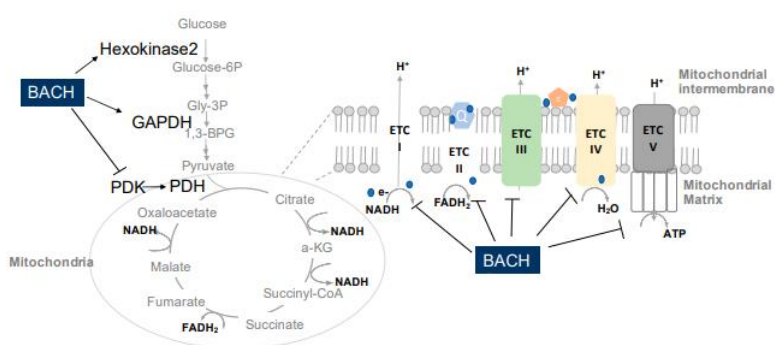


Figura 6. Esquema de la regulación de BACH1 sobre PDK y PDH.¹²

mostraron que **BACH1** se une a los promotores de los **genes PDK** en BM1 y MB436 (células con sobreexpresión de *BACH1*) pero no en las células MB468 (deficientes en *BACH1*).^{11, 12}

BACH1 suprime la incorporación de **glucosa** en el ciclo **TCA**, ya que los análisis metabolómicos muestran **niveles más altos de intermediarios de la glucólisis** y **más bajos de intermediarios del ciclo del TCA** en células de cáncer de mama triple negativo enriquecidas con BACH1.¹²

4.1.3 Respuesta antioxidante

El **sistema nervioso central (SNC)** contiene altos niveles de **ácidos grasos** que, mediante las reacciones de **peroxidación lipídica**, generan una cantidad creciente de **radicales libres** y **productos altamente reactivos** como 4-hidroxinonenal (**HNE**). Además, el **anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)**, el **peróxido de hidrógeno (H_2O_2)**, y **radical hidroxilo ($HO\cdot$)**, se producen continuamente como subproductos de la **respiración aeróbica** y otros procesos catabólicos/anabólicos. Las **ROS** también pueden actuar como **moléculas de señalización** en las células neuronales, por ejemplo, en la diferenciación mediada por ácido retinoico. Como resultado, las células neuronales son altamente **susceptibles al desequilibrio redox** y a **acumular daño oxidativo**.^{13,14,15}

Las células poseen varios mecanismos para **contrarrestar la sobreproducción ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS)**, incluidas **enzimas** como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Además, un sensor importante involucrado en la respuesta antioxidante es el **complejo de señalización KEAP1-NRF2-ARE**. (Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch – Factor 2 relacionado con el factor Nuclear Eritroide 2-Elementos de Respuesta Antioxidante).^{14,16}

El **estrés oxidativo (EO)** es el resultado del **desequilibrio** entre la producción de **ROS y RNS**, y la inducción de **defensas antioxidantes**. En condiciones de estrés, el factor de transcripción **NRF2** puede **disociarse** de su regulador negativo **KEAP1** en el **citósol** y trasladarse al **núcleo**, donde se une a las regiones **ARE** en el genoma para **promover la activación transcripcional** de enzimas antioxidantes, como la **hemooxigenasa 1 (HO-1)**, la **NADPH quinona oxidoreductasa (NQO1)** y múltiples componentes de la ruta del glutatión. El factor de transcripción **NRF2**, está **regulado negativamente por BACH1**, que **compite** con el complejo **KEAP1-NRF2-ARE**.^{13 - 16}

La **unión de BACH1 al ADN** depende estrictamente de su **dimerización** con proteínas **Maf** mediante el **dominio de cremallera de leucina (bZip)**. Recientemente se ha destacado el papel de **MafG** en **favorecer** la unión de BACH1 al ADN, mientras que otras pequeñas proteínas como **MafK** la **reprimen**.^{12, 14, 17}

La **exportación de BACH1** desde el **núcleo** también es el resultado de su **fosforilación** en **tirosina**, activada por la **respuesta antioxidante** y por **cadmio**, que induce una señal de **localización citoplasmática** en el extremo **carboxilo terminal de BACH1**. Después de su liberación en el citoplasma, BACH1 forma estructuras similares a fibras sobre los microtúbulos, en presencia de la **proteína de unión al ácido hialurónico intracelular**.^{13,17}

Como se ha comprobado tanto en un modelo de **ratón con SD (Ts2Cje)**, como en líneas celulares **linfoblásticas de SD humano**, la sobreexpresión de **BACH1** altera la **relación BACH1/NRF2** en el núcleo **disminuyendo** la **expresión** de genes de **respuesta antioxidante**, y dando como resultado una **acumulación de EO**. La fosforilación de NRF2 en Ser40 se asocia con una **reducción de los niveles de proteína HO-1**, como un índice de una respuesta antioxidante alterada.¹⁶

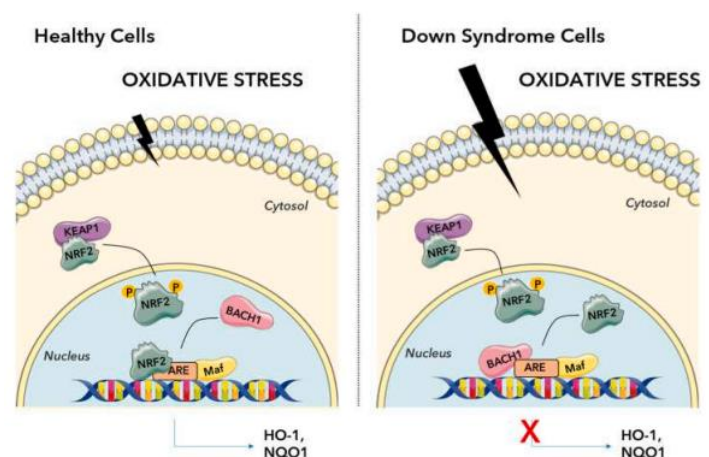


Figura 7. Vía BACH1/NRF2 en respuesta al estrés oxidativo.¹⁶

También se ha revelado que la administración de **éster fenílico del ácido cafeico (CAPE)** y su **análogo sintético VP961** promueve la **translocación nuclear de NRF2** suprimiendo su ubiquitinación, lo que mejora la respuesta antioxidante. Se probaron dos dosis (5 μ M y 10 μ M) para los compuestos CAPE y VP961 en condiciones de EO y se seleccionaron **CAPE 10 μ M y VP961 5 μ M** como protectoras en la línea celular de **neuroblastoma humana SH-SY5Y**. Ambas

sustancias conducen a una acumulación de **NRF2 dentro del núcleo**, con una **reducción significativa de la relación BACH1/NRF2**. Todo ello conduce a unos niveles de **HO-1** significativamente **elevados**.¹⁶

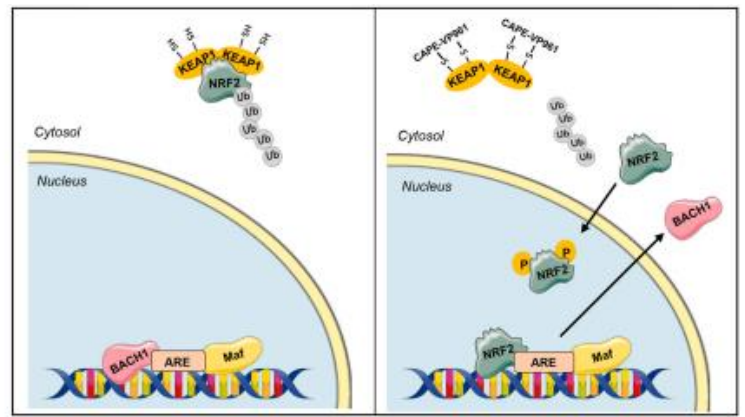


Figura 8. Esquema de la mejora de la respuesta antioxidante en células de pacientes con SD tras la administración de CAPE y VP961.¹⁶

La alteración del **cociente BACH1/NRF2** se ha estudiado igualmente en células **SH-SY5Y diferenciadas e indiferenciadas** expuestas a **H₂O₂**. **NRF2** se expresa en el citosol y se desplaza hacia el **núcleo** después de la exposición al peróxido de hidrógeno en ambos tipos celulares. En células **indiferenciadas**, **aumentó la unión de NRF2 a ARE** en respuesta al **EO**, mientras que en células diferenciadas no disminuyó la unión de **BACH1 a ARE** y, por tanto, no aumentó la unión de **NRF2**.¹⁴

La **catalasa dirigida a la mitocondria (mCAT)** es una enzima que contiene **partículas catiónicas lipofílicas** que le permiten atravesar el gradiente negativo de las mitocondrias y poder realizar su acción **antioxidante** convirtiendo **H₂O₂ en O₂ y H₂O en su interior**. Para comprender aún mejor el papel de **NRF2** se ha evaluado el efecto de la **mCAT** en **fibroblastos humanos con SD** y fibroblastos embrionarios de **ratón Dp16**. La expresión de **mCAT revirtió la disfunción mitocondrial y redujo los niveles de ROS**, lo que condujo a la inactivación de la estabilización y translocación de **NRF2**. También **mejoró el fenotipo senescente** de las células con SD, incluido el incremento de tamaño y la proliferación celular disminuida.^{15,18}

Estudios adicionales con **mCAT** en modelos de ratón han demostrado eficacia en el aumento de la **longevidad** en un 20% en ratones que expresan la proteína **β - amiloide**, y en general, una mejora de la **memoria de trabajo** y de la **memoria a corto plazo**.¹⁸

4.1.4 Uso de hemina

El **hemo** se une a dos factores de transcripción en mamíferos, **BACH1 y NPAS2**, y funciona como **inductor** y sustrato del sistema citoprotector **HO-1**. Existen dos isoformas de hemooxigenasa, **HO-2** se expresa de forma **constitutiva** en las células **neuronales**, pero se ha

demostrado que está especialmente regulada en respuesta a los **glucocorticoides** o medicamentos como **atorvastatina**.^{14,17,19}

HO-1 es la forma **inducible** del sistema HO, que lleva a cabo la **degradación** de la molécula **hemo** y genera **hierro libre (Fe²⁺)**, **monóxido de carbono** y **biliverdina**, compuestos con actividad **antioxidante**, **antiapoptótica** y **antiinflamatoria**. El hierro se une a la ferritina y la biliverdina se convierte en bilirrubina por la actividad de la biliverdina reductasa. **HO-1** está regulado al **alza** en respuesta a **ROS** e **isquemia**.^{14,17,19}

La expresión de **HO-1** está regulada **negativamente** por **BACH1** cuando los **niveles** de **hemo** son **bajos**, sin embargo, con **niveles altos** de hemo, **BACH1** se libera del ADN y es **exportado del núcleo** para su **degradación dependiente de ubiquitina**, lo que **libera** la supresión de la **transcripción del gen HO-1**. Estudios realizados en ratones nulos para *BACH1* mostraron niveles de expresión de ARNm de HO-1 significativamente más altos con respecto a los animales de control en todas las regiones del cerebro estudiadas.^{12,13}

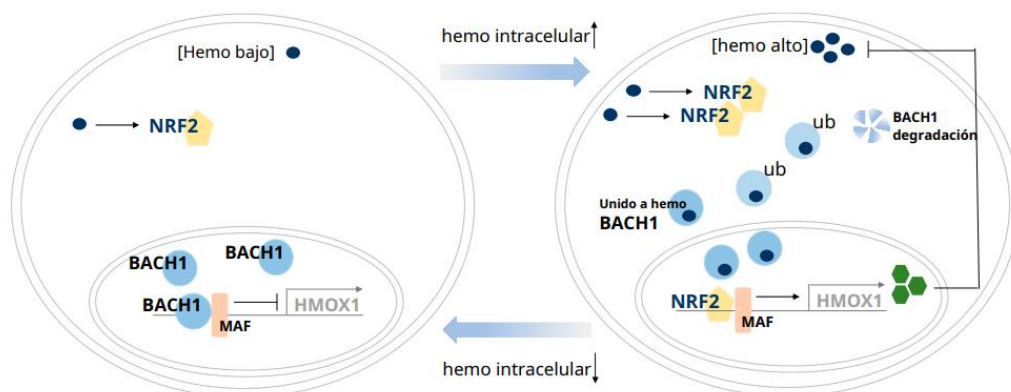


Figura 9. Relación de BACH1 con los niveles de hemo intracelular.¹²

El **análisis de PCR con transcriptasa inversa** en células **SH-SY5Y** ha demostrado que el **ARNm de HO-1** se expresa de manera diferente en **células indiferenciadas y diferenciadas** (con ácido trans-retinoico), tratadas con **500 µM H₂O₂** o **50 µM de terbutilhiroquinona (TBHQ)**. El nivel de **HO-1** es **menor** en las **células diferenciadas**, resultado que se confirmó mediante el análisis de Western Blot.¹⁴

La **biliverdina reductasa-A (BVR-A)** se coexpresa con **HO-1** para promover la **degradación del hemo** prooxidante en la molécula antioxidante **bilirrubina**. Además, BVR-A posee funciones pleiotrópicas a través de las cuales esta enzima regula la **señalización intracelular**. Entre estas funciones, está la de proteína de unión y transporte de **hemo**, y su papel en la modulación de la **expresión de genes** regulados por hemo. Se ha propuesto que el **transporte de hemo al núcleo** por BVR-A permitiría su entrega al represor transcripcional **BACH1**, que, al unirse, se **disocia del ADN** y es **reemplazado** por el factor de transcripción **NRF2**. **BVR-A** también es una quinasa que interactúa con miembros de la familia **MAPK**, en particular con las **quinasas reguladas por**

señales extracelulares (ERK1/2), que una vez se trasladan al **núcleo** regulan la **expresión** de los genes que responden al **EO**.^{13,14,19}

Estudios recientes mostraron que, tanto en la **EA** como en el **deterioro cognitivo leve**, **HO-1** y **BVR-A** sufren modificaciones **postraduccionales** oxidativas que **reducen** su actividad **antioxidante** y **neuroprotectora**. El aumento adicional de **EO** con el tiempo en el SD podría ser responsable de la **nitración** y el posterior **deterioro** de la **actividad** de **BVR-A**, lo que afecta **negativamente** tanto la producción de **bilirrubina** como la **respuesta** de estrés **celular** mediada por **BVR-A**.¹⁹

Se puede **inducir** la **degradación** de **BACH1** usando **hemina**, el ingrediente activo del medicamento **Panhematin**, aprobado por la FDA para el tratamiento de la **porfiria aguda**. La hemina es la **protoporfirina férrica IX** que se reduce a **ferroprotoporfirina IX** (hemo) dentro de las células. Las dosis probadas sobre ratones con las células **BM1** y **MB436** (**50mg/kg/día por vía intraperitoneal**) no son citotóxicas ni inhiben el crecimiento, pero sí son eficaces para **reducir los niveles de BACH1**.^{11,12,17}

Para probar la **especificidad** de la **hemina** por **BACH1** se generó un mutante de **BACH1** de ratón resistente a hemo, con **mutaciones** puntuales de **cisteína** a **alanina** en cuatro sitios que se requieren para la **unión de hemo** y la **liberación** de **BACH1** del ADN, para su **exportación nuclear** y posterior **degradación**. En consonancia con lo esperado, estas células fueron **resistentes** al tratamiento con **hemina**.¹¹

El tratamiento de **células de riñón embrionarias humanas HEK-293T** con **10 µM de hemina** o con **10 µM de cloruro de cadmio**, también resultó en la **exclusión nuclear de BACH1** y la consecuente **inducción de HO-1**. Se observó que la intensidad de la señal de **MafK** se mantuvo elevada en el **núcleo**, indicando que la **localización subcelular** de **BACH1** está regulada por un **aumento de los niveles de hemo** y en respuesta al **cadmio**. Dado que el **cadmio activa** las vías **p38** y **ERK1/2** para la **actividad** de **NRF2**, **BACH1** también está regulado por la señalización de estas vías. Sin embargo, **BACH1** permaneció en el **núcleo** en presencia de cadmio cuando las células se trataron con un **inhibidor de MEK1/2**. Por lo tanto, se ha sugerido que el **cadmio** puede **inactivar BACH1** a través de otro mecanismo además de la exportación nuclear del factor de transcripción.^{12,17,20}

Para comprobar si los **niveles endógenos de hemo** influyen en la **localización subcelular** de **BACH1**, se examinó el efecto de la **succinilacetona (SA)**, un **inhibidor** de la síntesis de hemo. Cuando se trataron las **células HEK-293T** con **SA**, **BACH1** se acumuló dentro de los **núcleos**, y tras inyectar **hemina** en estas células tratadas con **SA**, se observó una **relocalización citoplasmática de BACH1**.^{17,20}

Se ha demostrado que las **secuencias del dipéptido cisteína – prolina (CP)** en BACH1 son **esenciales** para la **exclusión nuclear** inducida por **hemo** comparando el efecto sobre la unión de la hemina de diferentes mutaciones sobre BACH1. Las mutaciones **CP3AP y CP34AP** abolieron la **interacción** entre **BACH1 y hemo**, estableciendo el **papel crítico** de estas secuencias en el proceso de interacción con hemo.¹⁷

Se realizó otro estudio con **hemina (2,5 M)** en células de **fibroblastos embrionarios murinos 3T3** en el que se indujo, no solo la **exportación nuclear**, sino también la **poliubiquitinación** y la **degradación** de BACH1. También se descubrió que **BACH2** está poliubiquitinado en respuesta al tratamiento con **hemina**.²⁰

4.1.5 Regulación de BACH1 mediante micro – ARN

El **micro ARN** es un fragmento pequeño de ARN que consta de unos 22 nucleótidos. El **micro – ARN – 98 – 5p** está relacionado con la **supervivencia** celular, la apoptosis y el **estrés oxidativo**, incluso reduce el **daño neuronal disminuyendo** los niveles de **ROS**. La **sobreexpresión** de este micro – ARN **suprime** la expresión de **BACH1**, aumenta la **translocación** nuclear de **NRF2** y promueve la **actividad de los ARE**.^{12,13}

El **micro – ARN – 532 – 5p** regula **negativamente BACH1** controlando la función de los pericitos musculares, la permeabilidad endotelial, la estabilidad vascular y la angiogénesis.¹²

4.1.6 Relación con HOIL – 1

Para investigar si **HOIL – 1** es una **ligasa E3 de BACH1**, se llevó a cabo un ensayo de **ubiquitinación in vitro** utilizando proteínas purificadas. HOIL-1 estimuló la **poliubiquitinación** de **BACH1** solo en presencia de las **enzimas E1 y E2**.²⁰

Las **mutaciones** en todos los **motivos CP** **redujeron** significativamente la **poliubiquitinación** mediada por HOIL-1, lo que sugiere una **participación** de algunos de los motivos CP en el proceso. Se determinó que una región central de **aminoácidos (426 – 503)**, que contiene los motivos **CP3, CP4 y CP5**, está involucrada en la unión de **HOIL-1**.^{19,20}

Cuando el **hemo** está presente en cantidades **excesivas**, **inactiva a BACH1**, en parte a través de la **poliubiquitinación y degradación** mediada por **HOIL-1**, lo que da como resultado la **inducción de HO-1**.^{19,20}

4.1.7 Vía de respuesta a las proteínas desplegadas (UPR) y PERK

La investigación adicional de los mecanismos moleculares que impulsan la **acumulación de proteínas oxidadas/desplegadas/mal plegadas** y agregados proteicos tóxicos, identificó una **regulación aberrante** de la **vía de respuesta a las proteínas desplegadas (UPR)** en el SD. La **UPR** comprende tres vías de señalización situadas en las proteínas de la membrana del retículo

endoplasmático: factor de transcripción activador 6 (**ATF6**), proteína quinasa del retículo endoplasmático similar al ARN (**PERK**) y quinasa que requiere inositol (**IRE1**).^{21,22}

PERK es una proteína transmembrana que se mantiene inactiva por la acción de la inmunoglobulina de unión a chaperona (**BiP**). Cuando detecta **EO**, se disocia de BiP, lo que permite su **dimerización** y posterior **autofosforilación**. **PERK** activado, fosforila la subunidad α del factor de iniciación eucariótico 2 (**EIF2 α**), bloqueando el inicio de la **traducción** de proteínas implicadas en la regulación redox, la síntesis de aminoácidos y la homeostasis de proteínas mitocondriales; y promoviendo la transcripción de genes antioxidantes.²²

Al investigar las cortezas frontales de SD humano, encontramos una **activación de PERK temprana y sostenida**. La atenuación crónica de la traducción es **perjudicial** para las neuronas. También observamos que la respuesta de **NRF2** está **desacoplada** de la **PERK**, y sus efectos **antioxidantes** están **reprimidos** en un mecanismo que implica a **BACH1**.^{21,23}

La **inhibición de PERK** con **GSK414** en ratones SD Ts2Cje confiere **neuroprotección**, ya que **reduce la fosforilación de PERK** rescatando su actividad. Sin embargo, este inhibidor no tiene efecto sobre la **fosforilación de la proteína tau** y la **sobreexpresión de APP**.²¹

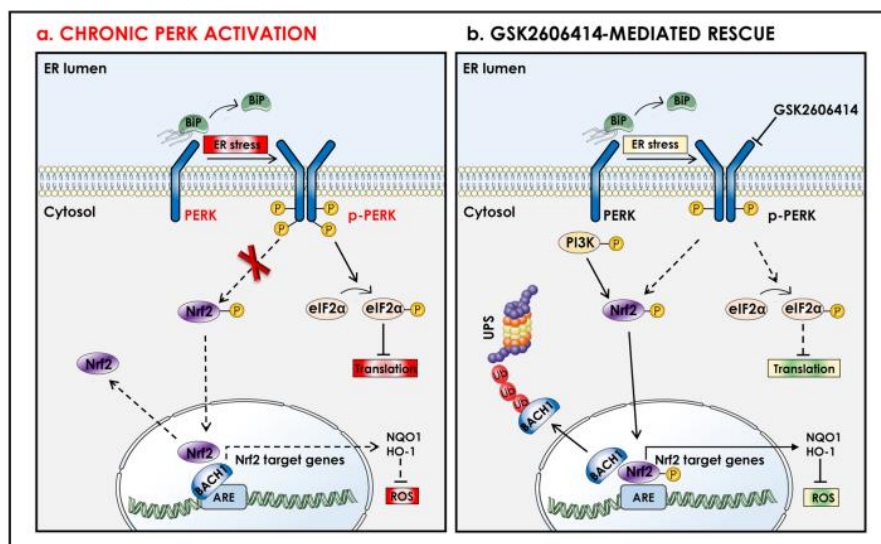


Figura 10. a) La activación crónica de PERK conduce a un aumento de EIF2 α , que ejerce su actividad inhibitoria sobre la traducción de proteínas. Paralelamente, PERK puede inducir la translocación de NRF2. Sin embargo, las muestras de SD demuestran la reducción de la respuesta antioxidante relacionada con NRF2, debido a la sobreexpresión de BACH1 y al desacoplamiento con la actividad de PERK. b) La inhibición farmacológica de PERK, por el compuesto GSK414, conduce a una mayor tasa de traducción de proteínas y a la inducción de la respuesta antioxidante.²¹

4.2 DYRK1A

4.2.1 Relación con la proteína tau y β - amiloide

La **sobreexpresión** de **DYRK1A** contribuye a la **β -amiloidosis**, ya que **hiperfosforila APP**, aumentando su escisión por las **β -** y **γ -secretasas** formando los péptidos **A β 40** y **A β 42**, componentes de las **placas amiloides** responsables de la **neurodegeneración**. DYRK1A también **fosforila la enzima de degradación de A β neprilisina**, y la enzima de **degradación de insulina**, disminuyendo su actividad. Además, DYRK1A colabora en la neurodegeneración mediante la **hiperfosforilación de la proteína tau**. La proteína tau es producida por el gen **MAPT** y su

principal función biológica es estimular el ensamblaje de los **microtúbulos** y estabilizar su estructura.²⁴⁻³⁰

El **splicing alternativo del exón 10** de la proteína **tau** genera isoformas con tres o cuatro repeticiones (**3R-tau** y **4R-tau**) de unión a microtúbulos en el cerebro humano adulto. Este proceso está regulado por **DYRK1A** mediante **fosforilación**, que **suprime la inclusión del exón 10** de tau y la **expresión de 4R-tau**. En el cerebro de ratones **Ts65Dn** y en **humanos** con SD, se ha encontrado un **incremento** en los niveles de **3R-tau** que se correlaciona con el nivel de **DYRK1A**. El **desequilibrio** de las **isoformas** de tau está asociado con la formación de **ovillos neurofibrilares** y, por lo tanto, con la **agregación de proteínas**.^{25,28,30}

DYR219, el inhibidor de bencimidazol DYRK1A, **disminuye** la **agregación de β - amiloide** y la **hiperfosforilación** de la proteína tau en modelos de *Drosophila*, y también revierte los **déficits motores**, así como la alteración de los **ritmos circadianos**.²⁷

4.2.2 Relación con cistationina – β - sintasa

CBS codifica una enzima dependiente de fosfato de piridoxal que convierte la **homocisteína** en **cistationina**, eliminándola del ciclo de la metionina e incorporándola al **ciclo de la cisteína**. CBS también es la principal enzima que **cataliza la producción de H_2S** en el SNC. Estudios realizados con ratones **TgCBS**, han evidenciado que la **sobreexpresión** de **CBS** induce un **déficit** en el **reconocimiento** de objetos novedosos y una **disminución** de la actividad **locomotora**.³¹

Saccharomyces cerevisiae contiene un homólogo funcional de **CBS**, **Cys4p**. Se probaron 2200 sustancias de tres bibliotecas químicas diferentes para suprimir la auxotrofia de metionina inducida por la sobreexpresión de **Cys4p**, seleccionando cuatro sustancias, entre ellas el **Disulfiram (DSF)**. El DSF es un fármaco **disponible en el mercado** para apoyar el tratamiento del alcoholismo crónico al producir una sensibilidad aguda al etanol. El tratamiento de **ratones TgCBS** con **10 mg/kg/día** de **DSF** es capaz de **restaurar** el **reconocimiento** de objetos novedosos.³¹

También hay datos *in vivo* de que la **inactivación farmacológica de CBS** con **aminooxiacetato** (**3 μ M**) en ratones **revierte los déficits neurológicos** funcionales, puesto que normaliza la producción de H_2S restaurándose el transporte de electrones mitocondrial a través del CIV.^{1,8}

4.2.3 Regulación por micro – ARN

En el sistema nervioso central, los **micro-ARN** están involucrados en la guía axonal, el control de la **neurogénesis** y la **plasticidad sináptica**. En consecuencia, un **desequilibrio** de los micro-ARN podría contribuir a la aparición de **enfermedades neurodegenerativas**.²⁸

El nivel de ARNm de **DYRK1A** se **reduce** por el **micro – ARN-1246**, cuya expresión es **inducida** por **p53** en respuesta al daño del ADN. Un estudio reciente identificó que la **sobreexpresión de micro – ARN-204-5p** regula **positivamente** la expresión del ARNm de **DYRK1A**, lo que lleva a la **muerte de las células dopaminérgicas** a través de DYRK1A.²⁴

4.2.4 Relación con Sinapsina 1 (SYN1)

Existen indicios de que **DYRK1A** no sólo está implicado en la neurogénesis, sino que también juega un papel en el **transporte de vesículas sinápticas**. La **sobreexpresión** de **DYRK1A** en fibroblastos y neuronas da como resultado la **inhibición de la endocitosis** debido a defectos en la endocitosis mediada por **clatrina**.^{24,32}

SYN1 es la única proteína que ha revelado un **residuo de serina** correspondiente a la secuencia de **fosforilación** de **DYRK1A**, Ser551, que se **hiperfosforila** con la **sobreexpresión** de DYRK1A y se defosforila después del tratamiento con un **inhibidor**. La **liberación de neurotransmisores** en la zona activa depende fuertemente de la **fosforilación de SYN1**, dejando de manifiesto el papel de **DYRK1A** en el **transporte de vesículas presinápticas**.³²

4.2.5 Localización subcelular

DYRK1A está presente tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células neuronales. La **sobreexpresión de DYRK1A** resultó en la **acumulación** de la proteína dentro del **núcleo**. Sin embargo, en un estudio realizado con ratones **TgDYRK1A**, el exceso de proteína se acumulaba en el **citoplasma**. Se descubrió que DYRK1A se une a la proteína de repetición **WD40 WDR68** y esta unión conduce a su **translocación nuclear** sin requerir ninguna quinasa, mientras que la relocalización al **citoplasma** ocurre cuando DYRK1A se asocia a la **proteína 1 asociada a la fitanoil – CoA hidroxilasa específica del cerebro**.²⁴

4.2.6 Participación en la neurogénesis cortical

El cerebro mantiene una proporción precisa entre la **excitación y la inhibición neuronal** para permitir un **aprendizaje eficiente**. Esta relación se establece temprano durante la **neurogénesis**, y está **alterada** en los cerebros de las personas con **SD** debido a un **exceso de inhibición**. También se ha informado de una **disminución de los botones excitatorios** (VGLUT1+) y un **aumento de los botones inhibidores** (VGAT1+).^{32,33}

La **proliferación neuronal** está **alterada** en individuos con **SD**. **DYRK1A** es un regulador **negativo** de la **transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular**. El análisis de Western Blot de extractos de proteína total de **células SH-SY5Y que sobreexpresan DYRK1A** reveló **cambios** en la **fosforilación** y una **disminución** de los **niveles** de proteína de los reguladores del ciclo celular **ciclina D1 y p27**, que conducen a una **detención de las células en la fase G1**. **G1** es una fase crítica que integra señales extracelulares que inducen una **nueva división celular** o la retirada

del ciclo celular y la **diferenciación**. En consecuencia, el **alargamiento de la fase G1** implica la salida del ciclo celular y promueve la **diferenciación prematura**, dando lugar a una **hipocelularidad** en la **corteza cerebral** del SD.^{24,29,34,35}

Las **variaciones** moderadas en los niveles de **ciclina D1** nuclear en las células madre neurales pluripotentes **sesgan su modo de división**, favoreciendo las **divisiones proliferativas** asimétricas cuando los niveles de ciclina D1 **disminuyen** y las **divisiones neurógenas** asimétricas cuando **aumentan**.^{34,35}

Se ha propuesto que otra proteína resultante de Hsa21, **RCAN1** interactúa de manera **cooperativa** con **DYRK1A** y conduce a una mayor **desregulación** de la vía de NFAT. **RCAN1** interactúa e **inhibe la calcineurina A**, una fosfatasa de serina/treonina dependiente de calcio y calmodulina, que **activa la NFAT** a través de su **desfosforilación**. Evidencia reciente sugiere que NFAT regula la **proliferación y diferenciación de células neuroprogenitoras**.^{29,36}

Además, la localización de **DYRK1A** en **axonemas ciliares** sugiere un papel en la **ciliogénesis**, como la **fosforilación de la β -tubulina** en la formación de microtúbulos. La **sobreexpresión de DYRK1A** conduce a la **reducción** de las **ramificaciones** y espinas **dendríticas** en el cerebro de modelos de ratones y humanos con SD.^{24,34}

4.2.7 Relación con la vía WNT/ β cationina

La **vía de señalización de WNT** es una cascada de transducción de señales que interviene en varios procesos biológicos, incluido el **desarrollo**, la función del **sistema nervioso adulto**, la función de las **células madre** y la **tumorigénesis**. La **activación** de la vía depende de la **translocación nuclear de β -catenina**, que impulsa la **expresión** de varios genes.³⁷

Para cuantificar bioquímicamente los **niveles de actividad** de señalización de **WNT**, se midieron las cantidades de proteína de **β -catenina 'libre'** (desfosforilada) observándose una **disminución** sustancial de **β -catenina activa** del **hipocampo** de ratones Tc1 e individuos con SD. La **disfunción** de esta vía de señalización podría contribuir potencialmente a la **susceptibilidad** diferencial al **cáncer** en el SD, como el aumento del riesgo de **leucemias**.³⁷

4.2.8 Inhibidores de DYRK1A derivados de productos naturales

La mayoría de los inhibidores son quinasas de **tipo I**, es decir, se unen al **ATP de la forma activa** de la **quinasa**.²⁶

- **Harmina**

La **harmina** (7-metoxi-1-metil- β -carbolina) es un alcaloide aislado de *Banisteriopsis caapi*. Es un inhibidor natural **competitivo** de ATP **selectivo** de DYRK1A, probado en ratones **Ts65Dn** con una concentración de **0,08 μ M**. El resultado fue la prevención de la maduración prematura

de NPC y **una menor fosforilación de tau**. El tratamiento con **harmina** suprime la expresión de 3R-tau y **promueve la expresión de 4R-tau** en las **células HEK -293T** de manera dependiente de la dosis. También reduce la **ansiedad** y el **deterioro de la memoria** en cerebros de ratones **Ts65Dn**, mejorando el rendimiento en el **laberinto de Morris**, un paradigma estándar de aprendizaje y memoria para roedores.^{24,30,38}

Sin embargo, la **harmina** tiene **efectos secundarios neurotóxicos** como la aparición de convulsiones, movimientos involuntarios y rigidez de las extremidades, que se deben a la inhibición de la recaptación de monoamino-oxidasa-A.^{25,38}

- **Epigallocatequina-3-galato**

La catequina más abundante del **té verde** es un inhibidor **no competitivo** de DYRK1A, al que se une en el residuo L457. **EGCG** actúa a través de dos mecanismos distintos, la **estimulación** de la vía de **señalización AMPc/PKA**, restaurando la capacidad de **fosforilación oxidativa mitocondrial**; y la **desacetilación** de **PGC1 α** dependiente de **sirtuina 1** (SIRT1), que promueve la **biogénesis mitocondrial**.^{5,36,39,40,41}

En cuanto a su **perfil metabólico**, aunque la mayor parte del **EGCG** y sus productos de degradación se excretan en la **bilis**, una parte del **EGCG** llega a la **circulación sanguínea**, alcanzando su punto máximo **1 - 2 h** después de su administración.⁴²

EGCG fue probado en modelos de **ratones** (Tg**DYRK1A**, Ts65Dn y Dp16) a **0,3 μ M**, y al mes de la administración **recuperó el déficit de aprendizaje** dependiente del hipocampo y **redujo** las estrategias de **aprendizaje inadecuadas**. Además, se normalizaron los niveles de **homocisteína**, previamente disminuidos. En otro estudio, **EGCG** **aumentó** significativamente la **proliferación** de células SH-SY5Y a **0,05 μ M**.^{33,40,42,43}

Usando ratones **Ts65Dn** se ha descubierto que el origen de las **anomalías craneofaciales** está en los **precursores** craneofaciales de células de la **cresta neural**, **deficientes** en el SD. Las células de la **cresta neural** contribuyen a la formación de la mayoría de los **huesos, cartílagos, tejido conectivo y tejido nervioso periférico** en el complejo craneofacial. **DYRK1A** puede controlar el desarrollo óseo a través de la vía **NFAT**. El tratamiento **prenatal con 0,3 μ M de EGCG** normalizó los fenotipos craneofaciales, especialmente la **bóveda craneal** y la morfología de la **cara**.^{39,44}

La **plasticidad sináptica**, capacidad de los animales para aprender y recordar, se ha relacionado con el **factor neurotrófico derivado del cerebro** (BDNF), regulado por **CREB**. **BDNF** es una de las neurotrofinas implicadas en la regulación de la **supervivencia y diferenciación neuronal**, con efectos en la **transmisión sináptica**. Los niveles de **ARNm de BDNF** son un 50% más **bajos**

en pacientes con **SD**. Este defecto también se corrige con el tratamiento con **EGCG** en ratones Ts65Dn y Ts1Cje.^{28,39}

El **EGCG** también ha sido utilizado en dos **ensayos clínicos** con **humanos**. En uno de ellos, 31 personas con SD, con edades comprendidas entre los **14** y los **29 años**, recibieron una dosis de **9 mg/kg/día** de **EGCG** durante 3 meses y mostraron una mejora significativa de su **memoria de reconocimiento visual**, su **memoria de trabajo**, su capacidad para controlar la **inhibición** y su **comportamiento adaptativo**.^{24,25,33,43}

El segundo ensayo clínico se realizó con 84 jóvenes con SD de entre **16** y **34 años**, y se comparó la **seguridad y eficacia** de **EGCG** (9 mg/kg/día durante 12 meses) **combinada** con **entrenamiento cognitivo** frente al **entrenamiento cognitivo solo**. El tratamiento **combinado** mejoró determinadas áreas de la **memoria**, **funciones ejecutivas** y competencias en la **vida cotidiana**.⁴⁰

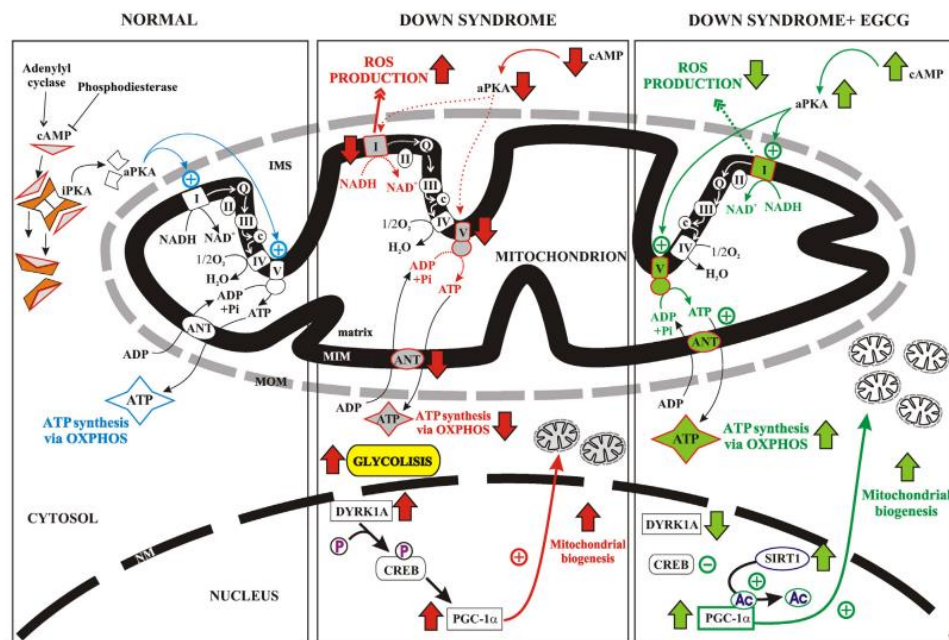


Figura 11. El tratamiento de las células del SD con EGCG estimula la vía de señalización de AMPc/PKA debido al aumento de los niveles de AMPc, con la consiguiente restauración de la eficiencia de OXPHOS mitocondrial y la reducción de la producción de ROS. Además, EGCG inhibe la actividad de DYRK1A, lo que impide la activación de CREB, mientras que la desacetilación/activación de PGC1 dependiente de SIRT1 aumenta fuertemente debido a la activación de SIRT1. Esto promueve un aumento notable en la biogénesis mitocondrial.⁵

Se ha descubierto que la exposición de **fibroblastos y células linfoblastoides** humanos con **SD** a **EGCG 20 µM** durante 24h restaura el **déficit de actividad de la ATPasa mitocondrial** e **impide** la **disminución** de la actividad del **CI**. Además, el tratamiento con **20 µM de EGCG** mejora la **expresión de 4R-tau** en células humanas diferenciadas.^{30,41}

Para comprobar la capacidad de **EGCG** para contrarrestar el **estrés oxidativo**, se midió la producción de **ROS** y la **peroxidación lipídica** en **linfoblastos** de SD. El tratamiento de **24h** con

20 μ M de **EGCG** evitó la **sobreproducción** de **anión superóxido** por parte de las mitocondrias e **impidió** el aumento de **H₂O₂**.⁴¹

Curiosamente, también se ha demostrado que el tratamiento con **EGCG prenatal** es capaz de **rescatar** el nivel de **PSD95**, un importante regulador de la **maduración sináptica** cuya alteración se observa en la **esquizofrenia** y el **autismo**.³³

- **Leucettina 41**

La **leucettamina B**, producto de la esponja marina *Leucetta microraphis*, se identificó como un **inhibidor** débil de DYRK1A. Se sintetizaron y optimizaron un gran número de análogos y derivados a los que se denomina colectivamente **leucettinas**. La **leucettina 41** es un análogo sintético de las **imidazolonas** derivado de los alcaloides de la esponja marina. Actúa como inhibidor **competitivo** del sitio de unión del ATP y tiene mayor **especificidad** para DYRK1A que la harmina y el EGCG.^{24,32,45}

La administración de leucettina 41 en **ratones Ts65Dn** corrigió los **déficits de memoria** y normalizó la actividad DYRK1A en el cerebro tras un mínimo de **12 días** de tratamiento. Se ha comprobado la **efectividad** de la **leucetina 41** (3 μ M) y de **poliandorcarpaminas A y B** (30 μ M) en células **SH-SY5Y**, valorando la **inhibición** de la **fosforilación** de la **ciclina D1**.^{24,32,45}

Además, el tratamiento con **leucettina 41** proporciona un mecanismo de protección a estos ratones contra el **deterioro cognitivo** inducido por la presencia de **β - amiloide** en la **memoria de trabajo** y la **memoria espacial**.²⁴

4.2.9 Inhibidores sintéticos de DYRK1A

- **CX-4945**

Es un inhibidor sintético **competitivo** de ATP de DYRK1A, derivado de la **harmina**, que, al ser administrado en un modelo de **ratón** con sobreexpresión de este gen, mostró la **normalización** de la **fosforilación de la proteína tau**. Sin embargo, CX-4945 es estructuralmente similar a la harmina por lo que podría producir **neurotoxicidad**.^{24,38}

- **Derivados de Benzotiazol**

INDY es un inhibidor **competitivo** sintético derivado de un inhibidor de proteína quinasa de doble especificidad (**CLK1**) llamado **TG003**, que puede inhibir la actividad de **DYRK1A** a través de la **disminución de la fosforilación de tau** en células **COS7** a **3 μ M**. Otro derivado, **BINDY** (**INDY** fusionado con **benzofuro**) presenta mayor **especificidad** por DYRK1A. Ambos se preparan a partir de **5-metoxi-2-metilbenzotiazol**.^{24,25,38}

FINDY y **CANDY** son dos nuevos inhibidores **sintéticos** de DYRK1A que actúan sobre la **estabilidad y/o la maduración** de DYRK1A. Estos inhibidores **eliminan** la **autofosforilación** de DYRK1A al **antagonizar** la interacción entre **DYRK1A** y la chaperona específica de quinasa **CDC37**. La consecuencia es una **desestabilización estructural** y la **degradación** de DYRK1A durante el proceso de maduración en células vivas.²⁴

- **ALGERNON**

Varios estudios han intentado la implantación de **células madre neurales euploides** en el cerebro de **ratones Ts65Dn** para mejorar el **desarrollo cerebral** o prevenir la **neurodegeneración**. El tratamiento de hembras embarazadas con una **generación alterada de neuronas** (ALGERNON), previno **anomalías cerebrales morfológicas**, incluida una placa cortical adelgazada. Además, este compuesto promovió la **neurogénesis** del giro dentado de ratones con **SD**.^{4,7,33,34}

La aplicación de tales estrategias en humanos está limitada por tres **razones** principales: la administración de genes o células es **invasiva** y debe **inyectarse** directamente en el **cerebro** para obtener la máxima eficacia; los efectos se **limitan** al sitio de **inyección** y las inmediaciones de la región inyectada; y los **efectos** de la terapia celular y génica son **transitorios**.^{4,7,33}

- **DANDY**

Los **derivados de hidroxí 3,5,-diaril-azaindoles** (DANDY) son inhibidores potentes, **competitivos** y **selectivos** de DYRK1A, y sustituyendo uno o dos de los grupos hidroxí por átomos de fluor se crearon los **F-DANDY**. Los estudios han demostrado que la administración de **20mg/kg** de F-DANDY **mejora** significativamente el **rendimiento** de los ratones **Ts65Dn** en el **laberinto de Morris**.^{38,46}

5.- DISCUSIÓN

5.1 ¿Es éticamente deseable la terapia fetal en el síndrome de Down?

Los argumentos a favor del tratamiento neurocognitivo pueden explicarse desde la perspectiva ética con los principios de **beneficencia**, **autonomía** y **justicia**. Hablamos de **beneficencia** porque elevar su cociente intelectual, permitirá a las personas con SD tener más control sobre sus propias vidas. Promover la **autonomía** de una persona es un objetivo moralmente valioso en sí mismo, supone una mayor **independencia**, competencia decisional y una mejor calidad de vida tanto para el niño como para la familia. La supresión de las barreras a la **igualdad de oportunidades** a causa de un trastorno o minusvalía puede ser considerada como una exigencia de **justicia**.^{10, 47}

La idea de desarrollar un tratamiento neurocognitivo para el SD también genera preocupaciones éticas con lo que se ha denominado el “**modelo social de la discapacidad**”, que se centra en las estructuras socioculturales que se encuentran detrás de las barreras para la participación igualitaria de las personas con deficiencias. Si bien la sociedad no es totalmente culpable, es cierto que al menos una parte de los problemas que enfrentan las personas con discapacidad como el SD podrían evitarse o atenuarse si la sociedad fuera más **inclusiva con la diversidad**.^{10,47}

Otro argumento que hay que tener en cuenta es el “**cambio de personalidad**”. El tratamiento no solo cambiaría algunas características relacionadas con la enfermedad, sino que afectaría la personalidad del individuo. No obstante, esto solo ocurriría al aplicar el tratamiento neurocognitivo en pacientes con SD cuyas personalidades ya se han formado, no en el caso de la terapia fetal para el síndrome de Down (**TFSD**).¹⁰

Además, la disponibilidad de un tratamiento neurocognitivo eficaz puede tener el beneficio adicional de brindar una **alternativa** para la **elección reproductiva** a las mujeres embarazadas (y sus parejas), cuando se descubre la gestación de un feto con trisomía. A las opciones de llevar a término el embarazo o interrumpirlo, se añadiría la opción de **continuar** el embarazo con **tratamiento**. Es un requisito que los beneficios potenciales de la terapia fetal superen los daños potenciales de la intervención, tanto para el futuro niño como para la mujer embarazada. La TFSD es una forma de terapia fetal **farmacológica no invasiva**, cuyos **riesgos** para la salud parecen ser **limitados** para ambos.⁴⁷

Actualmente la TFSD está en fase de **investigación**, y se debe evitar el “**concepto terapéutico erróneo**” al invitar a las mujeres a participar. Debe enfatizarse que la investigación se realiza porque aún no se sabe si la terapia es efectiva, y en caso de que lo sea dará lugar a un **mejor resultado neurocognitivo, no a una cura completa** para el SD en su totalidad.^{10, 47}

En este punto cabría preguntarse si una mejora parcial en el funcionamiento cognitivo puede hacer que las personas con SD solo sean más **conscientes de no poder** participar plenamente en la

sociedad o de realizar las opciones profesionales y reproductivas que están abiertas para los demás. También pueden ser más conscientes de la amenaza de desarrollar **demencia de inicio temprano**.⁴⁷

Claramente, la TFSD no deja de tener consecuencias para la ética de la **consejería reproductiva**, ya que la decisión de no abortar crea “prima facie” la **obligación moral** de hacer uso de la TFSD, si se demuestra que es efectivo, beneficioso y seguro.¹⁰

5.2 BACH 1

Los principales retos a los que se enfrentan las estrategias de tratamiento prenatal son la **teratogenicidad**, la **toxicidad** y las **consideraciones éticas**. Además, las terapias para **adultos**, incluso si resultan exitosas, solo mejorarán **parcialmente** el desarrollo cerebral y la cognición en el SD, debido a la **pérdida permanente de progenitores neuronales durante la vida fetal**.

La “**Teoría de los Radicales Libres del Envejecimiento**” postula un vínculo entre la **acumulación** progresiva de daño macromolecular causado por **ROS** y el proceso de **envejecimiento**, particularmente la detención celular en las células mitóticas, denominada **senescencia celular**. La principal fuente de generación de **ROS** dentro de las células son los **electrones** liberados de la **ETC**.¹⁵

El papel de **BACH1** como **regulador del metabolismo** ha sido reconocido recientemente y está siendo estudiado en la actualidad. Los mecanismos que impulsan las alteraciones metabólicas que se observan con la **inhibición** de este gen abren nuevas áreas de **investigación**.¹¹

Se ha demostrado que **BACH1** es un buen **objetivo terapéutico**, ya que los ratones **nulos** para **BACH1** son viables y se **desarrollan normalmente**, por lo tanto, puede inhibirse con pocos efectos secundarios. La **pérdida de BACH1** induce la **expresión** de los genes de la **ETC**, promueve la **respiración mitocondrial**, aumenta la **utilización de glucosa** en el ciclo de Krebs, y disminuye la **transcripción de PDK** y **fosforilación de PDH**, pasos clave que controlan la **glucólisis** y el **metabolismo mitocondrial**.^{11, 12}

La **relación BACH1/NRF2** en el **núcleo** tiene un papel fundamental en la regulación de la **respuesta antioxidante** ante la agresión del estrés oxidativo, ya que la **expresión génica** mediada por **ARE** depende de ella. BACH1 es un factor de transcripción **con cremallera de leucina** que **compite** con **NRF2** por unirse a los **ARE** que regulan la transcripción de enzimas **antioxidantes** (HO-1, NQO1).¹⁶

La alteración del **eje BACH1/NRF2** puede contribuir al desarrollo de **neuropatología** (Alzheimer o demencia) en los individuos con SD. Se ha comprobado en células **SH-SY5Y** que la **diferenciación celular** modifica la relación nuclear **BACH1/NRF2** en **respuesta a H₂O₂**.^{13,14}

Se ha demostrado que el tratamiento con **CAPE** y su análogo sintético **VP961** a mitad de dosis, **mejora la respuesta antioxidante** de NRF2 en **células SH-SY5Y**. Sin embargo, dado que los niveles nucleares de BACH1 no cambiaron después del tratamiento, la capacidad de CAPE y VP961 para rescatar la relación BACH1/NRF2 radica aparentemente de forma exclusiva en la **translocación nuclear de NRF2**.¹⁶

Con base en estos hallazgos, se plantea que **CAPE** y **VP961** pueden ser una **estrategia prometedora** para el tratamiento del SD. Deben diseñarse **estudios preclínicos** futuros para probar el papel de **VP961** no solo para **rescatar el eje BACH1/NRF2**, sino también su capacidad para modular **positivamente** los mecanismos neuronales subyacentes tanto a la **DI** como a la **neurodegeneración**.¹⁶

Es probable que el **EO** sea una **afección crónica** en el cerebro con SD, que se inicia durante el **desarrollo embrionario** y se **acumula** con el envejecimiento, lo que representa un fuerte factor de riesgo para la **neurodegeneración** posterior. Además, en los cerebros de las personas con SD, la **acumulación de péptido amiloide beta (Aβ)** se puede observar desde los **8 a los 12 años**, y esta acumulación **aumenta** durante la vida, lo que resulta en la **enfermedad de Alzheimer** hacia la **cuarta década** de la vida.^{13,14,19}

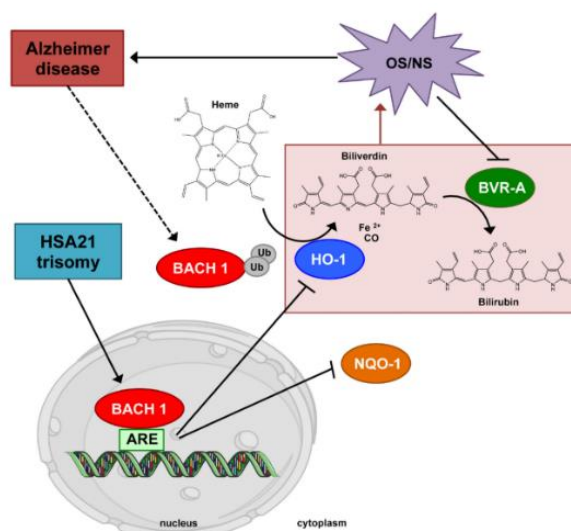


Figura 12. Escenario propuesto de modulación BACH1, señalización en patología SD y evolución a EA.¹⁸

Se considera que la vía **BACH1/HO-1** actúa como un bucle de **retroalimentación** que regula la homeostasis del **hemo** durante el **estrés oxidativo** sostenido. La **expresión** de la proteína **HO-1** en respuesta al estrés oxidativo ocurre principalmente en **células indiferenciadas** y favorece la **supervivencia** celular.¹²⁻¹⁴

La **monoubiquitinilación** está implicada en la **modulación** de la **función**, la compartimentación y las interacciones de las proteínas; mientras que la **poliubiquitinilación** es una señal de la **degradación** de las proteínas. Un **aumento** de los niveles de proteína **BACH1** junto con la **reducción** de la **monoubiquitinilación** de BACH1, sería responsable del **descenso de HO-1** y **NQO1** observado en el SD, mientras que el **aumento** de la **poliubiquitinilación** de BACH1 **impulsaría** los **niveles de HO-1** y **NQO1**.^{13,19}

El papel de **HO-1** en la **protección** de las células contra el **EO** se atribuye a los tres productos de su actividad, **ferritina**, **monóxido de carbono** y **bilirrubina**. Un ligero aumento de la **bilirrubina plasmática** mejora la función endotelial **previniendo** o reduciendo la gravedad de

las **patologías cardiovasculares y enfermedades metabólicas** y, además, **protege** contra la **muerte neuronal** inducida por isquemia/reperfusión.^{14,20}

Los niveles de **hemo** dentro de una célula pueden afectar a la **distribución nucleocitoplasmática** de **BACH1**. Los niveles **elevados**, estimulan la relocalización **citoplasmática de BACH1**, lo que hace que **ARE** sea accesible a **NRF2** permitiendo una coordinación simple y estrecha del metabolismo de hemo y la expresión génica. El **hemo** parece inducir la **degradación** dependiente del proteasoma de **BACH1** en el **citoplasma** después de su exportación nuclear, aunque no puede excluirse la posibilidad de que BACH1 también se degrade en el núcleo.^{17,20}

Existe evidencia de una **diferencia de género** en la **expresión fenotípica de la EA** en el **SD**. Las **mujeres** con SD de mediana edad tienen un **inicio más temprano** y una forma **más grave**, que se correlaciona con una **mayor densidad de ovillos neurofibrilares** neocorticales. Este hallazgo constituye un nuevo objetivo para las estrategias de intervención; modular la expresión del gen de la proteína tau asociada a los microtúbulos (**MAPT**), conocida por impulsar la **progresión de la EA**, ya que la expresión de **BACH1** contribuye a las **diferencias** moleculares de **género** observadas en las **taupatías y EA**.¹³

El hecho de que la **expresión de mCAT** sea suficiente para revertir la **estabilización de NRF2** sensible a redox destaca su eficacia como **antioxidante**, y subraya la relevancia de las **terapias mitocondriales** para preservar viabilidad y recuperación de la **función celular** en el SD y posiblemente en otras condiciones clínicas donde el **metabolismo energético** está **comprometido**.^{15,18}

PERK representa un objetivo farmacológico atractivo, y el diseño de enfoques terapéuticos que involucren la **inhibición farmacológica** de PERK en el contexto de la **neuropatología** del SD podría conducir a la **mejora del deterioro cognitivo**. La **inducción temprana de PERK** en el cerebro con SD podría representar una respuesta **protectora** al aumento prematuro de **EO**. Sin embargo, su **activación sostenida**, promueve la transición hacia un **fenotipo proapoptótico** y la progresión de patología similar a la **EA** con el **envejecimiento**.^{21,23}

La **inhibición farmacológica** con **GSK414** de **PERK** en ratones **Ts2Cje** de SD promovió la **translocación nuclear de NRF2**, favoreciendo el rescate del desequilibrio **BACH1/NRF2**. También se restablecieron los **niveles de HO-1**. La disminución de la activación de PERK favorece la **exportación nuclear de BACH1**, lo que puede estimular una mayor **degradación**. La **inducción crónica de PERK** ocurre en paralelo al **aumento de los niveles de APP** y **proteína tau**, lo que sugiere que los marcadores patológicos de la **EA** están fuertemente ligados a la inducción de **UPR**.²¹

5.3 DYRK1A

Dada la gran cantidad de evidencia que demuestra la participación de **DYRK1A** en los **defectos cerebrales** del SD, muchos estudios han evaluado el efecto de la **inhibición de DYRK1A** en las capacidades de **aprendizaje y memoria** de modelos de ratones e individuos con SD.²⁹

Las personas con SD desarrollan una **taupatía de aparición temprana**, debido a una **alteración** en el **equilibrio 4R- tau/3R-tau**. Por lo tanto, la **inhibición de DYRK1A** puede tener efecto en el tratamiento o prevención de la **enfermedad de Alzheimer**. Además, los **inhibidores de DYRK1A** tienen potencial como correctores de los **problemas de sueño** asociados con el SD, y probablemente efectos **beneficiosos** sobre la **cognición** y las **habilidades motoras**.^{27,30}

La **sobreexpresión de CBS** juega un papel importante en el **fenotipo de aprendizaje y memoria** detectado en el SD. En conjunto, los resultados de los experimentos con ratones **TgCBS**, muestran que las consecuencias de la **sobreexpresión de CBS** podrían ser tratadas **farmacológicamente** para restaurar parte del **rendimiento cognitivo alterado** en el SD. La **inhibición de CBS** debe ser **leve y solo parcial**, ya que una inhibición fuerte puede llegar a ser **perjudicial**.³¹

Cada vez hay más pruebas de que la **sobreexpresión de DYRK1A** en el SD afecta el **desarrollo del cerebro** y la **diferenciación neuronal**. **DYRK1A** se identificó recientemente como un **regulador negativo** de la **transición de la fase G1 a la fase S**, pero los mecanismos subyacentes en las neuronas siguen siendo en gran parte desconocidos. Una actividad **elevada de DYRK1A** promueve la **detención** de la **proliferación**, la **salida** del ciclo celular y la **diferenciación prematura**. La modulación del **número de copias de DYRK1A** puede **corregir** alteraciones de la **morfogénesis cerebral**.^{34,39}

Los resultados presentados en ratones **TgDYRK1A**, ponen de manifiesto una **disminución** de las tasas de **producción de neuronas** al principio y al final de la neurogénesis cortical. Este déficit se debe a que la **sobreexpresión de DYRK1A** altera los niveles de **ciclina D1**, disminuyendo la producción de **neuronas** derivadas de células madre neurales multipotentes. Además, se ha demostrado en ratones **Ts65Dn** que la **normalización** de la **expresión génica de DYRK1A** aumenta la cantidad de **ciclina D1 total y nuclear**, proteína que limita la **velocidad de transición** de la fase **G1 a la fase S**.³⁵

Parece probable que los principales cambios primarios en la **morfogénesis** y el **crecimiento** de la **bóveda craneal** podrían producir cambios menores en la **cara**, la **base del cráneo** y la **mandíbula** a través de interacciones reguladoras y pleiotrópicas complejas, pero se necesitan investigaciones adicionales para verificar esta hipótesis.⁴⁴

Se ha demostrado que **EGCG** es capaz de atravesar la **barrera hematoencefálica y placentaria**. En general, los resultados del **ensayo clínico en humanos** son consistentes con los efectos de EGCG encontrados en **ratones Ts65Dn** e indican que el tratamiento con **EGCG** a corto plazo puede ser **beneficioso** sobre la **cognición** en **adultos** jóvenes con SD. La administración de EGCG también indujo efectos positivos en la **calidad de vida**, el **funcionamiento social** y una mejora del **perfil lipídico**. Además, se ha demostrado que EGCG es una sustancia **segura** después de su administración repetida en humanos, sin alteraciones de la **función hepática y cardíaca**.^{33,39,40,43}

Además, el **EGCG** es capaz de restaurar la **fosforilación oxidativa**, promover la **biogénesis mitocondrial** y mejorar la **proliferación** de NPC en fibroblastos y células linfoblastoides de sujetos con SD estimulando las vías de señalización de **AMPc/PKA** y **SIRT1/PGC1 α** .^{36,41}

Se ha demostrado que la **sobreexpresión de DYRK1A** está relacionada con la **disminución** de las concentraciones plasmáticas de **homocisteína**, lo que sugiere que podría ser utilizada como **biomarcador de la eficacia** del tratamiento.⁴³

Las **leucettinas** constituyen una base muy prometedora para el diseño y la optimización de **inhibidores de quinasas más selectivos** para el tratamiento de los **déficits cognitivos** asociados al SD. Las imágenes de **resonancia magnética funcional** del cerebro de **ratones Ts65Dn** revelan que la **mejora cognitiva** es paralela a la **remodelación** de la conectividad funcional de las áreas centrales del cerebro involucradas en los procesos de **aprendizaje/memoria**.^{32,38}

Uno de los inhibidores de DYRK1A más recientes es **F-DANDY**, potente y no tóxico, cuya estabilidad metabólica en plasma y capacidad para cruzar la **barrera hematoencefálica** se traduce en efectos de **rescate cognitivo** en un modelo de **ratón** con SD.⁴⁶

6.- CONCLUSIONES

La elevada **prevalencia** del **síndrome de Down** lo convierte en la causa genética de **discapacidad intelectual** más frecuente, causado por una tercera copia del cromosoma 21 que conduce a una mayor producción de proteínas y enzimas codificadas por este cromosoma. Actualmente, **no existe cura** para el SD ni tratamientos eficaces para mejorar el **funcionamiento cognitivo** a pesar de las numerosas investigaciones destinadas a ello con **modelos de ratón**. Los programas de búsqueda de nuevos tratamientos se centran en **mejorar la cognición y retrasar** el desarrollo de la **demencia** en individuos con SD.

En base a la evidencia revisada en este trabajo, se sabe que la **neurogénesis** requiere una **función mitocondrial correcta** y los **períodos críticos** del **desarrollo cerebral** ocurren principalmente en las **etapas prenatal y neonatal** temprana, por tanto, cualquier estrategia desarrollada para **mejorar el funcionamiento del sistema de fosforilación oxidativa** en estos períodos podría convertirse en un **abordaje terapéutico** exitoso para el SD.

Como se ha visto, el equilibrio **BACH1/NRF2** en el núcleo está estrechamente relacionado con la respuesta frente al **EO**, y **promover** la producción de **antioxidantes** es también un mecanismo potencial para proteger el cerebro de los SD de la **neurodegeneración**. Una de las opciones más prometedoras respecto a este gen es la **hemina**, capaz de inducir la **degradación** de **BACH1**.

Varias estrategias dirigidas a **DYRK1A** con **inhibidores de quinasas** específicos han mostrado evidencias esperanzadoras de que las **condiciones cognitivas** del SD pueden **revertirse**. En este momento, se sabe poco sobre la posibilidad de **efectos adversos** causados por la inhibición de **DYRK1A**; no obstante, a medida que la **investigación** médica en esta área avanza, aprenderemos más sobre las consecuencias que resultan de la actividad reducida de **DYRK1A**.

Dentro de los inhibidores naturales de **DYRK1A**, los resultados de **EGCG** tanto en estudios *in vitro*, *in vivo* y en ensayos clínicos con humanos son bastante optimistas respecto a la recuperación de varias áreas de la memoria, fenotipos craneofaciales, **funciones ejecutivas** y competencias en la **vida cotidiana**. La **leucettina 41** también ha sido capaz de restaurar los déficits de memoria. Además, existe un creciente número de inhibidores **sintéticos**, entre ellos, **CX-4945**, **INDY**, **F-DANDY** y **ALGERNON**.

BACH1 y **DYRK1A** son genes que no se encuentran únicamente alterados en el SD, sino que también están involucrados en la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson, así como en el autismo y en el cáncer. Por tanto, su estudio conlleva múltiples implicaciones futuras en diferentes áreas.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Panagaki T, Randi EB, Szabo C. Role of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the regulation of proliferation and cellular bioenergetics in human Down syndrome fibroblasts. *Biomolecules*. 2020;10(4): 653 - 68. DOI: 10.3390/biom10040653
- 2.- Bayona-Bafaluy MP, Garrido-Pérez N, Meade P, Iglesias E, Jiménez-Salvador I, Montoya J, et al. Down syndrome is an oxidative phosphorylation disorder. *Redox Biol*. 2021; 41:1-12. DOI: 10.1016/j.redox.2021.101871
- 3.- Izzo A, Mollo N, Nitti M, Paladino S, Calì G, Genesio R, et al. Mitochondrial dysfunction in down syndrome: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Mol Biomed*. 2018;24(2): 1-8. DOI: 10.1186/s10020-018-0004-y
- 4.- Nakano-Kobayashi A, Awaya T, Kii I, Sumida Y, Okuno Y, Yoshida S, et al. Prenatal neurogenesis induction therapy normalizes brain structure and function in Down syndrome mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(38):10268-73. DOI: 10.1073/pnas.1704143114.
- 5.- Valenti D, de Bari L, de Filippis B, Henrion-Caude A, Vacca RA. Mitochondrial dysfunction as a central actor in intellectual disability-related diseases: an overview of Down syndrome, autism, Fragile X and Rett syndrome. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;46 (2):202-17. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2014.01.012
6. Papa S, de Rasmio D. Complex I deficiencies in neurological disorders. *Trends Mol Med*. 2013;19(1):61-9. DOI: 10.1016/j.molmed.2012.11.005.
7. Guedj F, Bianchi DW, Delabar JM. Prenatal treatment of Down syndrome: a reality? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2014;26(2):92-103. DOI: 10.1097/GCO.0000000000000056.
8. Panagaki T, Randi EB, Augsburg F, Szabo C. Overproduction of H₂S, generated by CBS, inhibits mitochondrial complex IV and suppresses oxidative phosphorylation in Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(38):18769-71. DOI: 10.1073/pnas.1911895116.
9. Piccoli C, Izzo A, Scrima R, Bonfiglio F, Manco R, Negri R, et al. Chronic pro-oxidative state and mitochondrial dysfunctions are more pronounced in fibroblasts from Down syndrome foeti with congenital heart defects. *Hum Mol Genet*. 2013;22(6):1218-32. DOI: 10.1093/hmg/ddt529.
10. de Wert G, Dondorp WJ, Bianchi DW. Fetal therapy for Down syndrome: an ethical exploration. *Prenat Diagn*. 2017;37(3):222-8. DOI: 10.1002/pd.4995
11. Lee J, Yesilkanal AE, Wynne JP, Frankenberger C, Liu J, Yan J, et al. Effective breast cancer combination therapy targeting BACH1 and mitochondrial metabolism. *Nature*. 2019;568(7751):254-258. DOI: 10.1038/s41586-019-1005-x
12. Padilla J, Lee J. A novel therapeutic target, BACH1, regulates cancer metabolism. *Cells*. 2021;10(3):634 - 47. DOI: 10.3390/cells10030634
13. Perluigi M, Tramutola A, Pagnotta S, Barone E, Butterfield DA. The BACH1/NRF2 axis in brain in Down syndrome and transition to Alzheimer disease-like neuropathology and dementia. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(9):779 - 94. DOI: 10.3390/antiox9090779
14. Piras S, Furfaro AL, Brondolo L, Passalacqua M, Marinari UM, Pronzato MA et al. Differentiation impairs BACH1 dependent HO-1 activation and increases sensitivity to oxidative stress in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):7568-80. DOI: 10.1038/s41598-017-08095-7
15. Zamponi E, Zamponi N, Coskun P, Quassollo G, Lorenzo A, Cannas SA, et al. NRF2 stabilization prevents critical oxidative damage in Down syndrome cells. *Aging Cell*. 2018;17(5):12812 - 24. DOI: 10.1111/ace.12812
16. Pagnotta S, Tramutola A, Barone E, Di Domenico F, Pittalà V, Salerno L, et al. CAPE and its synthetic derivative VP961 restore BACH1/NRF2 axis in Down Syndrome. *Free Radic Biol Med*. 2022;183:1-13. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed

17. Suzuki H, Tashiro S, Hira S, Sun J, Yamazaki C, Zenke Y, et al. Heme regulates gene expression by triggering Crml-dependent nuclear export of BACH1. *EMBO J.* 2004;23(13):2544-53. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600248
18. Oliver DMA, Reddy PH. Small molecules as therapeutic drugs for Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci.* 2019; 96:47-62. DOI: 10.1016/j.mcn.2019.03.001
19. Di Domenico F, Pupo G, Mancuso C, Barone E, Paolini F, Arena A, et al. BACH1 overexpression in Down syndrome correlates with the alteration of the HO-1/BVR-a system: insights for transition to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2015;44(4):1107-20. DOI: 10.3233/JAD-141254
20. Zenke-Kawasaki Y, Dohi Y, Katoh Y, Ikura T, Ikura M, Asahara T, et al. Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor BACH1. *Mol Cell Biol.* 2007;27(19):6962-71. DOI: 10.1128/MCB.02415-06
21. Lanzillotta C, Zuliani I, Tramutola A, Barone E, Blarzino C, Folgiero V, et al. Chronic PERK induction promotes Alzheimer-like neuropathology in Down syndrome: insights for therapeutic intervention. *Prog Neurobiol.* 2021;196:89-106. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2020.101892
22. Wiseman RL, Mesgarzadeh JS, Hendershot LM. Reshaping endoplasmic reticulum quality control through the unfolded protein response. *Mol Cell.* 2022;82(8):1477-91. DOI: 10.1016/j.molcel.2022.03.025
23. Lanzillotta C, Tramutola A, Meier S, Schmitt F, Barone E, Perluigi M, et al. Early and selective activation and subsequent alterations to the unfolded protein response in Down syndrome mouse models. *J Alzheimers Dis.* 2018;62(1):347-59. DOI: 10.3233/JAD-170617
24. Atas-Ozcan H, Brault V, Duchon A, Herault Y. Dyrk1a from gene function in development and physiology to dosage correction across life span in Down syndrome. *genes (Basel).* 2021;12(11):1833 - 62. DOI: 10.3390/genes12111833
25. Smith B, Medda F, Gokhale V, Dunckley T, Hulme C. Recent advances in the design, synthesis, and biological evaluation of selective DYRK1A inhibitors: a new avenue for a disease modifying treatment of Alzheimer's? *ACS Chem Neurosci.* 2012;3(11):857-72. DOI: 10.1021/cn300094k
26. Peauger L, Alix F, Papamicaël C, Besson T, Sopková-de Oliveira Santos J, Gembus V, et al. Straightforward access to a new class of dual DYRK1A/CLK1 inhibitors possessing a simple dihydroquinoline core. *Molecules.* 2022;28(1):36-56. DOI: 10.3390/molecules28010036
27. Zhu B, Parsons T, Foley C, Shaw Y, Dunckley T, Hulme C, et al. DYRK1A antagonists rescue degeneration and behavioural deficits of in vivo models based on amyloid- β , Tau and DYRK1A neurotoxicity. *Sci Rep.* 2022;12(1):15847 -61. DOI: 10.1038/s41598-022-19967-y
28. Chaves JCS, Machado FT, Almeida MF, Bacovsky TB, Ferrari MFR. MicroRNAs expression correlates with levels of APP, DYRK1A, hyperphosphorylated Tau and BDNF in the hippocampus of a mouse model for Down syndrome during ageing. *Neurosci Lett.* 2020;714: 1-6. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.134541
29. Feki A, Hibaoui Y. DYRK1A protein, a promising therapeutic target to improve cognitive deficits in Down syndrome. *Brain Sci.* 2018;8(10):187 -200. DOI: 10.3390/brainsci8100187
30. Yin X, Jin N, Shi J, Zhang Y, Wu Y, Gong CX, Iqbal K, Liu F. Dyrk1A overexpression leads to increase of 3R-tau expression and cognitive deficits in Ts65Dn Down syndrome mice. *Sci Rep.* 2017;7(1):619 -31. DOI: 10.1038/s41598-017-00682-y
31. Marechal D, Brault V, Leon A, Martin D, Lopes Pereira P, Loaëc N, et al. Cbs overdosage is necessary and sufficient to induce cognitive phenotypes in mouse models of Down syndrome and interacts genetically with Dyrk1a. *Hum Mol Genet.* 2019;28(9):1561-77. DOI: 10.1093/hmg/ddy447
32. Nguyen TL, Duchon A, Manousopoulou A, Loaëc N, Villiers B, Pani G, et al. Correction of cognitive deficits in mouse models of Down syndrome by a pharmacological inhibitor of DYRK1A. *Dis Model Mech.* 2018;11(9):1-17. DOI: 10.1242/dmm.035634

33. Souchet B, Duchon A, Gu Y, Dairou J, Chevalier C, Daubigney F, et al. Prenatal treatment with EGCG enriched green tea extract rescues GAD67 related developmental and cognitive defects in Down syndrome mouse models. *Sci Rep.* 2019;9(1):3914 -27. DOI: 10.1038/s41598-019-40328-9
34. Soppa U, Schumacher J, Florencio Ortiz V, Pasqualon T, Tejedor FJ, Becker W. The Down syndrome-related protein kinase DYRK1A phosphorylates p27(Kip1) and cyclin D1 and induces cell cycle exit and neuronal differentiation. *Cell Cycle.* 2014;13(13):2084-100. DOI: 10.4161/cc.29104
35. Najas S, Arranz J, Lochhead PA, Ashford AL, Oxley D, Delabar JM, et al. DYRK1A-mediated cyclin D1 degradation in neural stem cells contributes to the neurogenic cortical defects in Down syndrome. *BioMedicine.* 2015;2(2):120-34. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.01.010
36. Valenti D, de Bari L, de Rasmio D, Signorile A, Henrion-Caude A, Contestabile A, et al. The polyphenols resveratrol and epigallocatechin-3-gallate restore the severe impairment of mitochondria in hippocampal progenitor cells from a Down syndrome mouse model. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1862(6):1093-104. DOI: 10.1016/j.bbdis.2016.03.003
37. Granno S, Nixon-Abell J, Berwick DC, Tosh J, Heaton G, Almudimeegh S, et al. Downregulated Wnt/ β -catenin signalling in the Down syndrome hippocampus. *Sci Rep.* 2019;9(1):7322 - 42. DOI: 10.1038/s41598-019-43820-4
38. Nguyen TL, Fruit C, Hérault Y, Meijer L, Besson T. Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A) inhibitors: a survey of recent patent literature. *Expert Opin Ther Pat.* 2017;27(11):1183-99. DOI: 10.1080/13543776.2017.1360285
39. Guedj F, Sébrié C, Rivals I, Ledru A, Paly E, Bizot JC, et al. Green tea polyphenols rescue of brain defects induced by overexpression of DYRK1A. *PLoS One.* 2009;4(2):1-8. DOI: 10.1371/journal.pone.0004606
40. Gu Y, Moroy G, Paul JL, Rebillat AS, Dierssen M, de la Torre R, et al. Molecular rescue of DYRK1A overexpression alterations in mice with Fontup® dietary supplement: role of green tea catechins. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4):1404-23. DOI: 10.3390/ijms21041404.
41. Valenti D, De Rasmio D, Signorile A, Rossi L, de Bari L, Scala I, et al. Epigallocatechin-3-gallate prevents oxidative phosphorylation deficit and promotes mitochondrial biogenesis in human cells from subjects with Down's syndrome. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(4):542-52. DOI: 10.1016/j.bbdis.2012.12.011
42. Pervin M, Unno K, Nakagawa A, Takahashi Y, Iguchi K, Yamamoto H, et al. Blood brain barrier permeability of (-)-epigallocatechin gallate, its proliferation-enhancing activity of human neuroblastoma SH-SY5Y cells, and its preventive effect on age-related cognitive dysfunction in mice. *Biochem Biophys Res.* 2017; 9:180-6. DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.12.012
43. de la Torre R, de Sola S, Pons M, Duchon A, de Lagran MM, Farré M, et al. Epigallocatechin-3-gallate, a DYRK1A inhibitor, rescues cognitive deficits in Down syndrome mouse models and in humans. *Mol Nutr Food Res.* 2014;58(2):278-88. DOI: 10.1002/mnfr.201300325
44. McElyea SD, Starbuck JM, Tumbleson-Brink DM, Harrington E, Blazek JD, Ghoneima A, et al. Influence of prenatal EGCG treatment and DYRK1A dosage reduction on craniofacial features associated with Down syndrome. *Hum Mol Genet.* 2016;25(22):4856-69. DOI: 10.1093/hmg/ddw309
45. Loaëc N, Attanasio E, Villiers B, Durieu E, Tahtouh T, Cam M, et al. Marine-derived 2-aminoimidazolone alkaloids. Leucettamine B-related polyandrocarpamines inhibit mammalian and protozoan DYRK & CLK kinases. *Mar Drugs.* 2017;15(10):316 -31. DOI: 10.3390/md15100316
46. Neumann F, Gourdain S, Albac C, Dekker AD, Bui LC, Dairou J, Schmitz-Afonso I, et al. DYRK1A inhibition and cognitive rescue in a Down syndrome mouse model are induced by new fluoro-DANDY derivatives. *Sci Rep.* 2018;8(1):2859 -71. DOI: 10.1038/s41598-018-20984-z
47. de Wert GM, Dondorp WJ. Fetal therapy for Down syndrome: a pro-active ethical reflection. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2016; 160: 307 -11.

ANEXOS

Tabla 1. Resumen de las principales características de BACH1 y DYRK1A

BACH1
<ul style="list-style-type: none"> - Suprime de la transcripción de los genes mitocondriales de la ETC. - Activa la transcripción de PDK, impidiendo la actividad de PDH y la introducción de glucosa en el TCA. - Altera la relación BACH1/NRF2 en el núcleo disminuyendo la expresión de genes de respuesta antioxidante (HO-1 y NQO1). - La respuesta de NRF2 está desacoplada de la de PERK reprimiéndose sus efectos antioxidantes por una activación temprana y sostenida de PERK. - HOIL-1 estimula la poliubiquitinación de BACH1 en presencia de E1 y E2.
DYRK1A
<ul style="list-style-type: none"> - Hiperfosforila APP y la proteína tau; además, promueve el aumento de 3R-tau, conduciendo a la formación de ovillos neurofibrilares responsables de la neurodegeneración. - Participa en el transporte de vesículas sinápticas inhibiendo la endocitosis mediada por clatrina, mediante la fosforilación de SYN1. - Su asociación con WD40 WDR68 conduce a su translocación nuclear, mientras que la unión con la proteína 1 asociada a la fitanoil – CoA hidroxilasa específica del cerebro lleva a la relocalización citoplasmática. - Regula negativamente la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular por disminución de los niveles de ciclina D1 y p27. El alargamiento de la fase G1 produce una diferenciación prematura de las células madre pluripotenciales. - Cooperar con RCAN1 en la desregulación de la vía NFAT, implicada en la proliferación y diferenciación de células neuroprogenitoras. NFAT también participa en el desarrollo óseo.

Tabla 2. Resumen de los tratamientos prenatales para el síndrome de Down

DIANA	MODELO	TRATAMIENTO	RESULTADOS
CBS	Ratones con SD	3 μ M de aminooxiacetato	Revierte los déficits neurológicos funcionales Normaliza la producción de H ₂ S Restaura el transporte de electrones a través del CIV
CBS	Ratones TgCBS	10 mg/kg/día de DSF	Restaura el reconocimiento de objetos novedosos
BACH1	Células SH-SY5Y	10 μ M de CAPE 5 μ M de VP961	Promueven la translocación nuclear de NRF2 suprimiendo su ubiquitinación
BACH1	Fibroblastos humanos con SD Ratones Dp16	Expresión de mCAT	Revierte la disfunción mitocondrial Reduce los niveles de ROS Promueve la translocación nuclear de NRF2 Mejora el fenotipo senescente de las células
BACH1	Ratones BM1 y MB436	50 mg/kg/día de hemina	Promueve la exclusión nuclear y degradación mediada por HOIL-1 de BACH1
	Células HEK-293T	10 μ M de hemina	Relocalización citoplasmática de BACH1 tras tratamiento con succinilacetona
	Fibroblastos murinos 3T3	2,5 M	Induce la exportación nuclear, poliubiquitinación y degradación de BACH1
BACH1	Células HEK-293T	10 μ M de cloruro de cadmio	Promueve la exclusión nuclear y degradación de BACH1 Aumenta los niveles de HO-1
BACH1	Ratones Ts2Cj2	GSK414	Inhibe PERK Favorece la translocación nuclear de NRF2 Rescata el desequilibrio BACH1/NRF2 Reestablece los niveles de HO-1
DYRK1A	<i>Drosophila</i>	DYR219	Disminuye la agregación de β - amiloide y la hiperfosforilación de la proteína tau Revierte los déficits motores y la alteración de los ritmos circadianos
DYRK1A	Ratones Ts65Dn	0,08 μ M de harmina	Evita la maduración prematura de NPC Disminuye la fosforilación de la proteína tau Reduce la ansiedad y el deterioro de memoria
	Células HEK-293T	harmina	Promueve la expresión de 4R-tau de manera dependiente a la dosis
DYRK1A	Ratones TgDYRK1A, Ts65Dn, Dp16	0,3 μ M de EGCG	Recupera el déficit de aprendizaje Normaliza los niveles de homocisteína Normaliza los fenotipos craneofaciales
	Células SH-SY5Y	0,05 μ M de EGCG	Aumenta la proliferación celular
	Ratones Ts65Dn y Ts1Cje	EGCG	Corrige los niveles de ARNm de BDNF
	Adolescentes humanos con SD	9 mg/kg/día de EGCG	Mejora la memoria de reconocimiento visual, la memoria de trabajo, el control de la inhibición, funciones ejecutivas y competencias de la vida diaria
	Fibroblastos y células linfoblastoides humanas con SD	20 μ M de EGCG durante 24h	Restaura el déficit de actividad de la ATPasa mitocondrial Impide la disminución de la actividad del CI
	Células humanas diferenciadas	20 μ M de EGCG	Mejora la expresión de 4R-tau Evita la sobreproducción de anión superóxido y H ₂ O ₂
DYRK1A	Ratones Ts65Dn	12 días de Leucettina 41	Corrige déficits de memoria Protege frente al deterioro cognitivo
DYRK1A	Ratones con SD	CX-4945	Normaliza la fosforilación de la proteína tau
DYRK1A	Células COS7	3 μ M de INDY	Reduce la fosforilación de la proteína tau
DYRK1A	Ratones Ts65Dn	20mg/kg de F-DANDY	Mejora el rendimiento en el laberinto de Morris
DYRK1A	Ratones Ts65Dn	ALGERNON	Previene anomalías cerebrales morfológicas Favorece la neurogénesis