

Epigallocatequina-3-galato, um inibidor do gene DYRK1A, recupera déficits cognitivos em ratos modelos com síndrome de Down e em humanos

Rafael De la Torre^{1,2,3}, Susana De Sola¹, Meritxell Pons^{3,4}, Arnaud Duchon⁵, Maria Martinez de Lagran^{3,4}, Mag' i Farre' ^{1,6}, Montserrat Fito' ², Bessy Benejam⁷, Klaus Langohr^{1,8}, Joan Rodriguez¹, Mitona Pujadas^{1,2}, Jean Charles Bizot⁹, A' ida Cuenca^{1,10}, Nathalie Janel¹¹, Silvina Catuara⁴, Maria Isabel Covas², Henri Blehaut¹², Yann Herault⁵, Jean Marie Delabar¹⁰ and Mara Dierssen^{3,4}

¹Human Pharmacology and Clinical Neurosciences Research Group-Neurosciences Program, IMIM-Hospital del Mar Research Institute, Barcelona, Spain

²Cardiovascular Risk and Nutrition Research Group-Inflammatory and Cardiovascular Disorders Program, IMIM-Hospital del Mar Research Institute, and CIBER of Physiopathology of Obesity and Nutrition (CIBEROBN), Barcelona, Spain

³University Pompeu Fabra, CEXS-UPF, Barcelona, Spain

⁴Center for Genomic Regulation (CRG), and CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain

⁵Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, Translational Medicine and Neuroscience Program,

⁶Universitat Autonoma de Barcelona (UDIMAS-UAB), Barcelona, Spain`

⁷Fundacio Catalana Sindrome de Down, Barcelona, Spain

⁸Department of Statistics and Operations Research, Universitat Politecnica de Catalunya, Barcelona, Spain`

⁹Key-Obs S.A., Allee du Titane, Orleans, France`

¹⁰Epidemiology of Drugs of Abuse Research Group-Epidemiology and Public Health Program, IMIM-Hospital del Mar Research Institute, Barcelona, Spain

¹¹Adaptive Functional Biology, EAC CNRS, University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cite, Paris, France` ¹²Jer' ome Lejeune Foundation, Paris, France`

IGBMC, CNRS, INSERM, Universite de Strasbourg, UMR7104, UMR964, and Institut Clinique de la Souris, ICS, GIE' CERBM, Illkirch, France

Abbreviations: **DS**, Down syndrome; **DYRK1A**, dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A; **EGCG**, epigallocatechin gallate; **GSH-Px**, glutathione peroxidase; **Hcy**, Homocysteine; **HSA21**, human chromosome 21; **IQ**, Intellectual quotient; **oxLDL**, Oxidized LDL; **TgDyrk1A**, Transgenic mice overexpressing *Dyrk1A*

E-mail: mara.dierssen@crg.es

Escopo: Trissomia do cromossomo humano 21 resulta na síndrome de Down (SD), que está entre as alterações genéticas mais complexas que levam à deficiência intelectual. A compilação de dados sugerem que a superexpressão do gene DYRK1A (*Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A*, gene que expressa uma enzima reguladora que causa fosforilação em alguns resíduos de aminoácidos tirosina) é um crítico patogênico no mecanismo de déficit intelectual.

Métodos e resultados: Aqui foi mostrado que o flavonoide epigallocatequina-galato (EGCG) do chá verde, um inibidor DYRK1A, recupera o déficit cognitivo, tanto da trissomia 16 segmentar (Ts65Dn) em camundongos transgênicos com superexpressão Dyrk1A quanto em um background genético trissômico ou dissômico, respectivamente. Ele também reverteu significativamente o déficit cognitivo em um estudo piloto em pessoas com SD com efeitos de reconhecimento de memória, memória de trabalho e qualidade de vida. Foram utilizados ratos modelos para garantir que EGCG seja capaz de reduzir a atividade cinase da DYRK1A no hipocampo e descobriu que ele também induziu alterações significativas nos níveis plasmáticos de homocisteína, que foram correlacionadas com os níveis de expressão do gene Dyrk1A. Assim, poderíamos usar níveis plasmáticos de homocisteína como um biomarcador de eficácia em nosso estudo humano.

Conclusão: Concluimos que o EGCG é uma ferramenta terapêutica promissora para a melhoria cognitiva em SD, e sua eficácia pode depender da sua ação de inibição do gene Dyrk1A.

1 Introdução

Benefícios para a saúde das catequinas do chá verde na prevenção de doenças cardiovasculares [1], quimioprevenção do câncer [2], infecção [3], e como neuroprotetores em doenças neurodegenerativas [4] foram amplamente postulados na comunidade científica. No entanto, sua eficácia *in vivo* e os mecanismos moleculares são difíceis de elucidar e continuam a ser uma tarefa desafiadora. No entanto, a segurança de extratos de chá verde e de sua principal catequina ativa, a galato de epigallocatequina flavonoide (Epigallocatechin gallate flavonol, EGCG) permite fácil aplicação em modelos *in vitro* e em animais para testes clínicos em humanos. Recentemente, foi relatada a eficácia do EGCG na promoção da neurogênese adulta [5] o que incentivou a sua aplicação em distúrbios do desenvolvimento neurológico e neurodegenerativos clínicos. Neste contexto, um relatório anterior também sugeriu efeitos benéficos da EGCG em modelos animais com síndrome de Down (SD) [6].

A trissomia do cromossomo humano 21 (HSA21) resulta em DS (OMIM 190685) e é um dos distúrbios cromossômicos humanos mais comuns. Enquanto a trissomia afeta todos os tecidos, a reduzida capacidade cognitiva está entre as mais limitantes características em SD [7,8]. Mesmo que não haja uma contribuição de regiões não codificantes para o fenótipo, é provável que o desequilíbrio de dosagem de alguns genes individuais em HSA21 contribui diretamente para alguns fenótipos. Assim, normalizando os níveis de expressão ou a função de genes críticos poderia prevenir ou reverter os efeitos deletérios da superdosagem dos genes. DYRK1A é um possível gene candidato para explicar

alguns fenótipos de SD [revisado em [9,10]]. Ele está localizado na região crítica da SD HSA21 [11, 12], e codifica para uma cinase de dupla fosforilação para resíduos de treonina/serina e de tirosina. Em camundongos desequilíbrio na dosagem de Dyrk1A, *in vivo*, afeta a estrutura do cérebro, da aprendizagem e da memória [13,14]. Expressão reduzida do gene Dyrk1A em camundongos heterozigotos produz microcefalia [15], e compromete a neuritogênese [16] levando à redução do tamanho e complexidade de ramos dendríticos. Camundongos heterozigotos também mostram déficits de aprendizagem e memória visuo-espaciais. Da mesma forma, superexpressão do gene Dyrk1A em camundongos transgênicos (TgDyrk1A) pode comprometer a cognição e a existência de árvores dendríticas menos complexas [17, 18]. Curiosamente, comprometimento cognitivo e alteração da árvore dendrítica em TgDyrk1A é observado em de ratos Ts65Dn, um modelo do rato SD tendo em trissomia 88 de 161 genes que codificam para proteínas clássicas presentes no HSA21, [19-21]. Isto sugere o gene Dyrk1A como causa básica e aponta sua normalização como terapia potencial para SD.

EGCG é um inibidor potente e seletivo da atividade do gene DYRK1A [22]. Trabalhos anteriores mostraram que o tratamento pré-natal com EGCG poderia parcialmente recuperar alterações cerebrais em crias transgênicos com superexpressão do gene Dyrk1A e foi capaz de normalizar os níveis de algumas proteínas relacionadas com a plasticidade sináptica no hipocampo de camundongos transgênicos Dyrk1A adulto, sugerindo possíveis efeitos cognitivos [6]. Neste trabalho, exploramos, pela primeira vez, se EGCG poderia recuperar as alterações cognitivas em ratos adultos com SD e em um estudo piloto em indivíduos com SD. Usamos ratos trissômicos e transgênicos para determinar os possíveis efeitos do tratamento EGCG de curto prazo na melhoria da função cognitiva, em particular, sobre os déficits de memória em adultos e identificar os biomarcadores da eficácia EGCG para normalizar a atividade Dyrk1A que poderia, então, ser usado em pacientes. Em seguida, realizamos um piloto duplo-cego, randomizado controlado por placebo avaliando a segurança de EGCG e seus efeitos clínicos em adultos jovens com SD. **Concluimos que EGCG recupera déficits cognitivos em ratos trissômicos (Ts65Dn) e pessoas com SD, possivelmente através da normalização da atividade da DYRK1A.**

2 Materiais e métodos

2.1 Estudos farmacológicos pré-clínicos

2.1.1 Modelos de ratos

Ratos TgDyrk1A foram obtidos como descrito anteriormente [13]. Fêmeas de camundongos B6EiC3Sn a / A-Ts (1716) 65Dn (Ts65Dn) foram obtidas a partir de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) e criados com machos B6C3BF1 euploides [23]. Jovens adultos machos (3 meses de idade), foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (TgDyrk1A ou Ts65Dn e suas correspondentes ninhadas do tipo selvagem, com placebo ou EGCG). De interesse para o presente trabalho, Dyrk1A superdosagem em TgDyrk1A apresentaram níveis semelhantes de superexpressão do que os detectados em ambos os cérebros de SD fetais e o Ts65Dn trissômico modelo parcial [24]. Foram utilizados os seguintes transgênicos (TgDyrk1A) grupos: WT não tratados n = 13; TG (TgDyrk1A) –não tratados n = 16; WT-EGCG n = 16; TG-EGCG n = 14 Para o trissômico (Ts65Dn) utilizamos: WT-não tratado n = 19; Ts65Dn não tratada n = 14; WT-EGCG n = 22; Ts65Dn-EGCG n= 14.

2.1.2 Declaração ética

Os animais foram criados e mantidos sob SPF condições ambientais normais, e todos os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com as políticas de bem-estar animal e aprovado pelo comitê de ética local (Comitê Ético de Experimentação Animal do PRBB (CEEAPRBB); números de procedimentos MDS-08-1060P1 e JMC-07-1001P1-MDS). Todos conheciam as regulamentações locais (lei 5/1995 Espanhol e decreta 214/97, 32/2007; Ministério francês da Agricultura lei 87/848) e europeus (diretivas da UE 86/609 e 2001-486) para a regulamentação e as normas para a utilização de animais de laboratório n A5388-01 (NIH). A CRG está autorizada para trabalhar com organismos geneticamente modificados (A / ES / 05 / I-13 e A / ES / 05/14). Às equipes de pesquisa envolvidas nos experimentos foram concedidas a acreditação oficial para realizar as experiências relatadas.

2.1.3 Administração do EGCG

Ratos foram administrados EGCG na água potável por 1 mês. A solução EGCG foi preparada na hora com base em extrato de chá verde [Mega Extrato de Chá Verde, levemente descafeinado (0,8% de cafeína) Vida Extension®, EUA; Teor de 326,25 mg de EGCG por cápsula] a cada 3 dias (concentração: 90 mg EGCG / mL para uma dose de 2-3 mg por dia). Para testar EGCG efeitos cognitivos, TgDyrk1A ou Ts65Dn e seus correspondentes ninhada do tipo selvagem, com placebo ou

EGCG, foram testados em uma aprendizagem dependente do hipocampo através de um labirinto de água (WM; ver [13,25]) e uma tarefa de reconhecimento de objeto novo.

2.1.4 Testes de aprendizados e memória

2.1.4.1 Labirinto de água

Para testar o efeito de EGCG na cognição espacial dependente do hipocampo, os ratos foram treinados em um labirinto de água (WM), após ter sido administrado EGCG em água potável durante 30 dias. TgDyrk1A ou Ts65Dn e seus irmãos de ninhada do tipo selvagem correspondentes, com placebo ou EGCG foram testados. O labirinto de água consiste de uma piscina circular cheia de água morna (19 C) opacificada por adição de tinta não tóxica branca. A plataforma de escape branco foi localizada a 1 cm abaixo da superfície da água numa posição fixa. Cortinas brancas com padrões pretos apostos cercaram o labirinto para fornecer um conjunto de informações espaciais. Ratos aprenderam a posição da plataforma escondida com quatro ensaios por dia, durante 5 ou 6 dias, dependendo da estirpe [ver [9]], até os animais atingiram os níveis de desempenho assintótica (melhor nível de execução). Em cada ensaio, os ratos foram colocados num dos locais de partida de modo aleatório e foram deixadas para nadar até à plataforma localizada. Ratos que não conseguiram encontrar a plataforma em 60s foram colocadas sobre ele por 20 s e foram devolvidos à sua gaiola, no final de cada prova. Para avaliar a memória de referência de uma sessão de sonda foi realizada 24 horas após a última sessão de aquisição. Nesta sessão, a plataforma foi removida e os ratos foram autorizados a nadar por 60 s. Todos os ensaios foram gravados e rastreados com um sistema de rastreamento de imagem (SMART Panlab, Espanha). Latências de fuga, velocidade de natação, porcentagem de tempo gasto em cada quadrante da piscina foram monitorados e computados. Referência da memória foi quantificada na sessão comparando a quantidade de tempo gasto pelos ratos por quadrante alvo em relação à média dos três outros quadrantes da piscina.

2.1.4.2 Reconhecimento de objeto novo

Ratos foram testados para déficits de aprendizagem e memória na tarefa de reconhecimento do objeto novo [25]. Esta tarefa baseia-se na tendência inata de roedores para explorar novos objetos diferencialmente sobre objetos familiares. TgDyrk1A ou Ts65Dn e suas correspondentes da mesma ninhada de tipo selvagem, com placebo ou EGCG, receberam uma sessão de habituação em uma área circular de 30 min em apenas um dia. Na sessão de treino 24 h mais tarde, os ratinhos foram colocados no centro da arena e permitiu explorar dois objetos idênticos, durante 10 min. Após o período de treino, o roedor foi removido a partir do ambiente por um período de atraso, que variou de 1 a 24 horas, dependendo do tipo de memória a ser testado em cada estirpe. Após o atraso, o roedor é devolvido a caixa, onde um novo substituiu um dos objetos originais. Para cada rato, os objetos foram aleatoriamente designados como familiares ou novos. Também a localização dos novos objetos (esquerda ou direita) é contrabalançada entre os grupos. O tempo de exploração para o familiar (TF) e o novo objeto (TN) durante a fase de teste foi gravado. A memória foi operacionalmente definida pela percentagem de exploração do objeto novo (índice de discriminação DI), como a proporção de tempo que os animais passaram a investigar o novo objeto menos a proporção passou a investigar o objeto familiar no período de testes [Discriminação Index, $DI = [(Novel\ objeto\ Exploração\ Time - objeto\ Familiar\ Exploração\ Time) / Total\ Tempo\ de\ Exploração] \times 100$].

2.1.5. Análises Bioquímicas

2.1.5.1 Atividade do gene DYRK1A

A atividade de cinase de proteína DYRK1A foi determinada a partir hipocampo (6 ratos por grupo) de acordo com o protocolo publicado previamente [26].

2.1.5.2 Atividade do biomarcador do plasma para Dyrk1A: Homocisteína

O efeito de EGCG em homocisteína no plasma (Hcy) foi avaliado desde a expressão do gene Dyrk1A estar correlacionada com o Hcy no plasma total em SD [27]. Hcy total do Plasma foi definida como a concentração total de homocisteína após clivagem redutiva de todas as ligações dissulfeto. Hcy total foi determinada utilizando um método fluorimétrico de HPLC [28]. Verificamos, também, se a administração crônica EGCG foi capaz de alterar significativamente a atividade Dyrk1A em amostras de cérebro de camundongos transgênicos TgDyrk1A.]

3. Ensaio clínico piloto

3.1 Participantes

Trinta e um jovens adultos com síndrome de Down com idade entre 14 a 29 anos estavam registrados com base em grande grupo de pacientes ambulatoriais da "Fundación Catalana Síndrome de Down" (FCSD, Barcelona).

3.2 Critérios de exclusão

Indivíduos com doença neurológica outras que não SD, doença médica relevante, transtorno de comorbidade mental ou atualmente fazendo qualquer tratamento que possa interferir com a função cognitiva ou alterar qualquer biomarcadores chave e parâmetros bioquímicos analisados no estudo foram excluídos. Outros critérios de exclusão comum aplicado a todos os participantes foram: (i) ter sofrido de qualquer doença grave ou submetidos a cirurgia de grande porte nos últimos 3 meses antes do estudo; (ii) medicação regular no mês anterior ao estudo. Exceções foram feitas para doses únicas de medicação sintomática administrada até a semana anterior ao julgamento; (iii) a ingestão atual de suplementos vitamínicos ou catequinas ou AINE nas duas semanas anteriores ao estudo; (iv) história de gastrointestinal, hepática, renal ou quaisquer outros problemas que podem alterar a absorção, distribuição, metabolismo, excreção ou da droga; (v) dieta vegetariana; (vi) a prática de exercício físico por mais de 2 horas por dia ou o consumo de energia de mais de 3000 kcal por semana.

3.3 Randomização e mascaramento

O desenho do estudo foi randomizado com grupos de cegos e paralelas duplas. Os participantes foram aleatoriamente designados para EGCG (n = 15; mesma preparação como para modelos animais) ou placebo (n = 16, cápsulas duras de gelatina idênticas contendo açúcar mascavo).

3.4 Declaração ética

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética local (CEICParc de Salut Mar, EGCG / DYRC1A / DS / IMIM / 1, ClinicalTrials.gov Identificador: NCT01394796) e conduzida de acordo com os padrões

éticos da Declaração de Helsinque. Os participantes, pais e / ou responsáveis legais (em caso de incapacidade legal) foram informados sobre o protocolo que se seguiu e deram o seu consentimento informado por escrito antes da inscrição.

3.5. Administração de EGCG

Os participantes atribuídos ao grupo de tratamento ou o placebo receberam uma ou duas cápsulas por dia, dependendo do peso corporal, com uma dose oral de EGCG média de 9 mg / kg / dia (média de 6,9-12,7). Durante a visita de inscrição, os participantes receberam recomendações dietéticas para evitar alimentos suplementados com ácido fólico e matérias vegetais verdes. Médico, bioquímicos e explorações neuropsicológicas foram realizadas no Mar del Instituto de Pesquisa Médica do Hospital (IMIM), e consistiu em quatro avaliações durante um período de seis meses: linha de base, após 1 e 3 meses de tratamento, e 3 meses após a interrupção do tratamento. Vinte e nove participantes completaram o ensaio de seis meses: 13 do grupo de EGCG (dois levantamentos) e 16 do grupo placebo. Dois participantes experimentaram efeitos colaterais: um no grupo de EGCG apresentaram um aumento na excitabilidade que exigia a retirada do tratamento e um no grupo necessária a redução da dose de tratados com placebo devido à dor abdominal (2-1 cápsulas por dia), mas continuaram no estudo. Outro participante foi excluído devido ao não cumprimento da administração EGCG (Informações de Apoio Tabela 1; CONSORT fluxograma; <http://www.consort-statement.org/supplementary>).

3.6 Testes Neuropsicológicos

A bateria neuropsicológica abrangente foi realizada para avaliar velocidade psicomotora, atenção, memória episódica, funções executivas, e precisão visuomotor (ver Informações de Apoio Tabela 3). Os testes foram apresentados em uma ordem fixa para permitir intervalos entre tentativas adequadas sobre as medidas de memória episódica. Versões paralelas disponíveis para a memória episódica e testes de função executiva foram usados durante as avaliações de acompanhamento, para controlar os efeitos de aprendizagem. Os pais e cuidadores completaram escalas de capacidade funcional na vida diária, comportamento adaptativo e qualidade de vida. Quanto aos testes computadorizados, foram

utilizadas apenas as versões para adultos dos testes selecionados a bateria de testes neuropsicológicos automatizados de Cambridge (Cantab).

3.7 Dados qualitativos sobre os efeitos do tratamento

Uma breve entrevista semi-estruturada auto conduzida foi realizado com os pais no final do julgamento de seis meses com o objetivo de obter feedback sobre o desempenho do estudo e coleta de dados qualitativos sobre as suas impressões subjetivas de diversos parâmetros de interesse relacionados com os efeitos do tratamento: noção de trabalho em grupo (tratamento / placebo) antes de parar o tratamento cego, presença ou ausência de alterações relevantes ao longo do estudo (funcionais, cognitivas, comportamentais, clínicos, ou outros) e as alterações específicas observadas.

3.8 Análises Bioquímicas

As amostras de sangue (25 ml) foram coletadas após jejum 10-14h para análises bioquímicas gerais. As concentrações totais de homocisteína foram determinados por ELISA de micropartículas (MEIA, Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, EUA). Aspartato aminotransferase (AST / GOT) e alanina transaminase (ALT / TGP) séricas, glicemia, colesterol total e triglicérides foram analisados por métodos enzimáticos padrão. Colesterol LDL foi calculada pela fórmula de Friedewald. Triglicérides foram sempre <300 mg / dL. A LDL oxidada (oxLDL) no plasma foi medida por um procedimento de ELISA em sanduíche (oxLDL, Mercodia, Uppsala, Suécia). Glutathione peroxidase (GSH-Px), o plasma foi medido utilizando hidroperóxido de cumeno como oxidante glutathione (Ransel RS 505, Randox Laboratories, Crumlin, UK). A adesão ao tratamento e biodisponibilidade foram analisadas medindo EGCG plasma por HPLC / MS.

3.9 Análises estatísticas

Para os experimentos em ratos avaliamos diferenças significativas utilizando ANOVA two-way seguido de Bonferroni / Dunnet testes post hoc. Efeito do tratamento sobre Hcy plasmática foi analisada através de duas vias (genótipo * tratamento) ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni /

Dunnet post hoc. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Análises de correlação de Spearman dos níveis de homocisteína e níveis Dyrk1a foram realizados pela primeira vez em separado sobre o tipo selvagem e modelos animais Ts65Dn ($p < 0,1$ foi considerado significativo); os dois grupos foram, portanto, analisados em conjunto. Os dados foram expressos como média \pm SEM. O software estatístico SPSS foi utilizado para a análise.

Para os indivíduos com SD, uma análise descritiva das variáveis sociodemográficas, clínicas e bioquímicas de ambos os grupos (EGCG e placebo) no início do estudo foi realizada por meio de frequências absolutas e relativas, no caso de variáveis categóricas, bem como medidas de desvio padrão médios e quantitativa. O efeito do tratamento após 3 meses foi estimado para as variáveis clínicas, bioquímicas e cognitivas no âmbito dos modelos de ANCOVA. Para evitar um possível viés devido a diferenças entre os grupos no início do estudo, esses modelos incluídos ambos os valores de referência e de gênero como covariáveis. Além disso, o nível de deficiência intelectual (leve / moderado, contra grave) foi incluído nos modelos para as variáveis cognitivas. Foram calculados intervalos de confiança de 95% para o efeito do tratamento. O pacote de software estatístico R (A Fundação para R Statistical Computing) foi utilizado para todas as análises.

4 Resultados

4.1. EGCG recupera déficit cognitivo em Ts65Dn e ratos TgDyrk1A

No labirinto aquático de Morris, embora os ratos não tratados TgDyrk1A superexpressando Dyrk1A de uma forma dissômica (dois cromossomos) apresentou uma ligeira, mas não significativa deficiência na aprendizagem visuo-espacial e memória. **O seu desempenho foi significativamente melhorado por EGCG** (Fig. 1A). Pobres estratégias de aprendizagem, avaliados em percentagem do tempo gasto na periferia da piscina (ataxia), também foram observadas em TgDyrk1A não tratado (Informações de Apoio Fig. 1A, ANOVA com Bonferroni, $p < 0,01$), que foram recuperados por EGCG (Informações de Suporte Fig. 1A, ANOVA com Bonferroni, $p < 0,01$). Finalmente, TgDyrk1A não tratado mostrou memória prejudicada (Fig. 1C, ANOVA seguido de análise de Bonferroni, $p < 0,01$), referência que foi novamente melhorada por EGCG (Fig. 1C, ANOVA seguido por pós hoc de Bonferroni, $p < 0,05$). Inversamente, EGCG não modificou o desempenho de ratinhos de tipo selvagem (Fig. 1A).

Para garantir que o efeito de EGCG foi relevante para SD, foi testado o tratamento no modelo de ratinho parcial trissômico Ts65Dn. Ratos Ts65Dn apresentaram déficits de aprendizagem espacial (Fig. 1b, ANOVA de medidas repetidas, efeito do genótipo: $p < 0,0001$), e um comportamento de ataxia marcada durante as sessões de aquisição de informação de apoio (Fig 1B, ANOVA de medidas repetidas, efeito do genótipo: $P < 0,0001$), que foram recuperados por EGCG (Fig. 1B e Informações de Apoio Fig. 1B, ANOVA medidas repetidas efeito do tratamento, $p < 0,05$), sem afetar o desempenho em tipos selvagens. No teste comprobatório, ratinhos Ts65Dn mostraram novamente estratégia táxica (Fig. 1E, ANOVA com Bonferroni $p < 0,001$), o que foi recuperado pelo tratamento de EGCG (Fig. 1E, ANOVA com Bonferroni, $p < 0,05$).

O EGCG também recuperou o comprometimento da memória de reconhecimento de objetos exibidos por ratos Ts65Dn e TgDyrk1A no teste de reconhecimento do objeto novo. Ambos os ratos Ts65Dn e TgDyrk1A apresentou um déficit claro no reconhecimento novidade como mostra um índice de reconhecimento significativamente menor (Fig 2A e 2B, nos dois sentidos genótipo ANOVA \times interação objeto com Bonferroni como post hoc.: WT não tratado versus TgDyrk1A não tratado $p < 0,01$; WT não tratado contra Ts65Dn não tratado $p < 0,01$). EGCG recuperou significativamente novos reconhecimento de objetos em ambos os transgênicos (Fig 2A, nos dois sentidos genótipo ANOVA \times interação tratamento com Bonferroni como post hoc.: TgDyrk1A não tratado contra TgDyrk1A EGCG $p < 0,01$) e Ts65Dn (Fig. 2B, $p < 0,01$). Curiosamente, EGCG prejudicou o reconhecimento de novos objetos em camundongos selvagens (Fig 2A, WT não tratado contra WT EGCG.: Two-way ANOVA interação genótipo-tratamento com Bonferroni como post hoc $p < 0,01$).

4.2 Atividade do gene *Dyrk1A* e biomarcadores de plasma

Atividade cinase da DYRK1A foi aumentada no hipocampo de ratinhos TgDyrk1A (Fig. 3A, one-way ANOVA $p < 0,01$), devido a superexpressão de Dyrk1A. EGCG normalizou a atividade da DYRK1A cinase em animais transgênicos, mas não induziu alterações significativas em camundongos selvagens (Fig. 3A, ANOVA de duas vias de interação genótipo-tratamento com Bonferroni como post hoc $p < 0,01$).

Hcy no plasma foram correlacionados com os níveis Dyrk1A cerebrais (Fig 3D; Correlação Spearman $Rho = 0,73$, $p = 0,027$). Em condições basais, uma diminuição dos níveis plasmáticos de homocisteína foi detectada em TgDyrk1A e modelos animais Ts65Dn (Fig. 3B e

3C), como também já foi descrita em pacientes com SD [29]. Um mês de tratamento com EGCG normalizou os níveis plasmáticos de homocisteína de ambos TgDyrk1A e Ts65Dn aos níveis do tipo selvagem não tratados, embora o efeito só alcançaram significância estatística em camundongos trissômicos (Fig.3 Banda 3C, two-way ANOVA interação genótipo-tratamento com Bonferroni como pós hoc: TgDyrk1A $p = 0,06$; Ts65Dn $p < 0,01$).

4.3 Ensaio Clínico Piloto

Vinte e nove participantes (Tabela 1), equilibrados por sexo (51,7% masculino e 48,2% feminino) e idade ($22,2 \pm 4,2$ anos em EGCG e $20,6 \pm 2,2$ no grupo placebo) entre os grupos de tratamento, foram incluídos. Ambos os grupos tiveram a frequência escolar similar em centros de educação especial ou padrão ($14,86 \pm 2,6$ vs $15,38 \pm 2,4$ para EGCG e grupo placebo, respectivamente). Quociente intelectual (QI) médio foi semelhante para ambos os grupos, dentro da faixa de deficiência intelectual moderada (QI = $45,9 \pm 7,8$ em EGCG contra $42,4 \pm 6,4$ no grupo placebo). O grupo EGCG mostrou uma taxa mais elevada de indivíduos com trissomia do cromossomo 21 ($76 \cdot 9\%$) contra grupo placebo ($68 \cdot 7\%$). Além disso, um indivíduo teve translocação ($7 \cdot 6\%$) no grupo de EGCG ao passo que um indivíduo era mosaico ($6 \cdot 2\%$) no grupo do placebo. Variações genéticas da SD de seis indivíduos permaneceram desconhecidos, dois ($15 \cdot 3\%$) no grupo de EGCG e quatro (25%) no grupo do placebo.

A avaliação clínica e bioquímica não revelou diferenças significativas entre os grupos em AST, GOT ou valores ALT (GPT), após 3 meses de tratamento (Informações de Apoio Tabela 2). As concentrações plasmáticas de colesterol ($173,7 \pm 26,0$ placebo contra EGCG $153,8 \pm 22,0$ mg / dL, $p = 0,02$) e LDL-colesterol ($111,6 \pm 24,8$ vs $88,9 \pm 22,1$ mg / dL, $p = 0,014$) foram significativamente reduzidos após 3 meses de tratamento EGCG. O desempenho foi observado em triglicerídeos, HDL-colesterol, glicose, e atividade da GSH-Px (Informações de Apoio Tabela 2).

Embora as concentrações de plasma de EGCG não tenham diferido entre os sexos ou o tempo de avaliação ($94,4 \pm 45,2$ vs $89,4 \pm 49,3$ ng / mL, primeiro contra o terceiro mês), foi detectado um aumento significativo de Hcy após 1 mês de tratamento, (Efeito do tratamento com 1 mês $p = 0,024$, $9,7 \pm 1,5$ vs $11,6 \pm 2,6$, teste t de Student) permanecendo abaixo do valor crítico (15-20 M), que foi mantida ao longo do tratamento, e retornou aos valores basais após a descontinuação do tratamento.

De acordo com a tabela de 3, os efeitos sobre o desempenho neuropsicológico ajustado para sexo, QI e valores basais EGCG. Encontramos efeitos significativos da EGCG em memória episódica e memória de trabalho após 3 meses de tratamento. Indivíduos tratados com EGCG mostrou uma porcentagem significativamente maior de respostas corretas em reconhecimento a memória visual (padrão imediato reconhecimento de memória percentuais corretos, $p = 0,04$) em comparação com placebo (Fig. 4). A tendência de diferenças significativas também foi encontrada para o desempenho da memória de trabalho entre os grupos placebo e EGCG, o antigo mostrou uma taxa de erro inferior (Spatial Span erros para trás totais; $p = 0,08$). Além disso, as análises mostraram uma tendência para efeitos do EGCG na velocidade psicomotora (MOT) e um melhor funcionamento social sobre a qualidade Kidscreen 27 do índice de vida (Apoio Social e Peers, $p = 0,05$; Informações de Apoio Tabela 4) em comparação com placebo. Após 3 meses de interrupção do tratamento, os efeitos diminuíram e a porcentagem de acertos na memória de reconhecimento de padrões imediato diminuiu voltando para medidas de linha de base (Fig. 4). Além disso, a análise descritiva sobre os efeitos do tratamento obtidos dos pais no final (Informações de Apoio Tabela 5) mostrou que a maioria dos pais achavam que o tratamento com EGCG causou bom efeitos, e relataram uma ampla gama de alterações, referindo específico efeitos positivos, ao passo que a maioria dos pais de condição placebo não relataram mudanças relevantes.

5 Discussão

O objetivo do presente estudo foi investigar os potenciais benefícios da normalização da atividade de DYRK1A; uma cinase altamente expressa em SD, no desempenho cognitivo em modelos de ratos e em humanos com SD. Nós descrevemos a melhoria da função cognitiva, tanto em modelos de rato SD e humanos tratados com EGCG, um inibidor específico da DYRK1A. Nós também verificamos vantagem dos modelos animais para a prova da utilização dos níveis plasmáticos de homocisteína, como um biomarcador de atividade DYRK1A no hipocampo. Nosso estudo apoia o uso de inibidores DYRK1A, e, especificamente, de EGCG, ferramentas terapêuticas como promissoras para a melhoria cognitiva em DS.

Em trabalhos anteriores, observamos que a EGCG pode recuperar parcialmente algumas alterações morfológicas cerebrais em crias transgênicos com superexpressão Dyrk1A [6] e normalizou os níveis de algumas proteínas relacionadas com a plasticidade sináptica no hipocampo de camundongos

transgênicos adulto Dyrk1A. No entanto, neste trabalho inicial, os ratos testados apenas superexpressos Dyrk1A em um outro contexto genético dissômico, e além disso não sabíamos se haviam os possíveis efeitos cognitivos. No presente estudo utilizou-se novamente camundongos com superexpressão única de Dyrk1A em um contexto genético dissômico (TgDyrk1A), mas eles eram adultos, e também incluídos na análise de um modelo trissômico parcial bem estabelecida na SD nos ratos Ts65Dn [23]. Nossos resultados indicam que um mês de administração oral de EGCG recupera o déficit de aprendizagem dependente do hipocampo, tanto TgDyrk1A e Ts65Dn sem afetar o desempenho de tipos selvagens.

Além de um efeito geral sobre a aprendizagem dependente do hipocampo, estratégias de aprendizagem inadequadas (ataxia) foram reduzidas em camundongos Ts65Dn e TgDyrk1A tratados com EGCG. Assim, **podemos concluir que a EGCG foi capaz de recuperar os fenótipos derivados de superexpressão de Dyrk1A** em camundongos transgênicos e no modelo de trissomia parcial de Ts65Dn. Isto sugeriu que o efeito patológico impulsionado pela superexpressão de Dyrk1A é relevante para SD, e que Dyrk1A é um forte candidato para a terapia. Nosso trabalho anterior [30] já demonstrou que os defeitos córtico-estriato funcionais poderia ser corrigido através da inibição específica da expressão Dyrk1A usando vetores de adenovírus (AAVshDyrk1A) em camundongos TgDyrk1A [31], mas aqui demonstramos que também a normalização da atividade da cinase em ratos adultos podem recuperar os fenótipos cognitivas. No entanto, uma vez que é um gene Dyrk1A é sensível a dosagem, a redução da sua atividade de cinase poderia ser prejudicial em ratinhos de tipo selvagem. Pode-se argumentar que as diferentes regiões do cérebro envolvidas em ambas as tarefas têm sensibilidade diferencial a funcionalidade DYRK1A cinase. No entanto, embora EGCG normalizou a atividade de cinase de DYRK1A no hipocampo em TgDyrk1A ao mesmo regime de dosagem que melhorou ensaios dependentes do hipocampo (Fig. 3A), mas surpreendentemente, as mesmas doses não alteraram a atividade da cinase em ratinhos de tipo selvagem. Isso se encaixa com a falta de efeitos observados no labirinto aquático de Morris em camundongos selvagens, e pode sugerir que os efeitos deletérios no teste de reconhecimento de objeto pode depender de mudanças da atividade Dyrk1A em regiões corticais que não foram testadas ou outros efeitos da polifenol não mensurados no presente estudo.

Uma vez que nós quisemos avaliar os efeitos do tratamento em seres humanos, o passo seguinte foi o de assegurar que a atividade da normalização da cinase DYRK1A pode ser medido utilizando um biomarcador de plasma que pode ser detectado, em seguida, mediante tratamento com EGCG em

humanos. Os nossos estudos anteriores mostraram que a superexpressão de Dyrk1A está relacionada com a diminuição das concentrações plasmáticas de homocisteína em ratinhos TgDyrk1A Ts65Dn e sugerindo que a homocisteína pode ser um biomarcador adequado correlacionada com Dyrk1A DS em [27]. Nós aqui demonstramos uma correlação significativa entre os níveis plasmáticos de homocisteína no cérebro e de Dyrk1A (Fig. 3D) em ratos Ts65Dn. Ratos Ts65Dn apresentaram diminuição dos níveis plasmáticos de homocisteína semelhante ao que foi descrito em indivíduos com SD [29]. Um mês de tratamento com EGCG normalizados os níveis reduzidos de homocisteína no plasma de ambos TgDyrk1A e Ts65Dn para níveis de tipo selvagem não tratados. Estas experiências serviram como uma prova de conceito de que as défices de aprendizagem causadas por Dyrk1A superexpressão pode ser recuperados por normalização da atividade da Dyrk1A e que os níveis de homocisteína no plasma pode ser utilizado como um biomarcador.

Em seguida, explorou-se os efeitos de EGCG no desempenho cognitivo em adultos jovens com SD, com especial atenção para a função do hipocampo. Concretamente, além de outras medidas (ver Secção 4) foi utilizada uma tarefa de reconhecimento visual que media o processamento visuoperceptual, o componente mais fraco da memória visual em indivíduos com SD. Esta medida revelou-se sensível ao funcionamento do hipocampo, em particular do córtex perirrinal, que é criticamente envolvido na memória de reconhecimento de objetos [32-35] e é reduzido de tamanho em SD [36]. Indivíduos tratados com EGCG apresentaram maior precisão no reconhecimento visual de memória [37,38] e espacial memória de trabalho [39], o que sugere um efeito positivo deste composto também sobre o sistema pré-frontal, em particular ventromedial, ventrolateral e córtex dorsolateral. No geral, os resultados deste estudo piloto são consistentes com os efeitos do EGCG encontrados em camundongos TgDyrk1A e Ts65Dn e timidamente indicam que o tratamento EGCG de curto prazo é capaz de induzir efeitos benéficos sobre a cognição em adultos jovens com SD, provavelmente atuando em redes hipocampo pré-frontal funcionais distribuídos de apoio habilidades de memória.

Administração EGCG também induziu efeitos positivos na qualidade de vida e funcionamento social. Isso foi detectado por meio de medidas objetivas, como a bateria Kidscreen, e também em um levantamento de pais / cuidadores em que impressões subjetivas positivas de melhoria cognitiva leve e / ou melhoria do controle comportamental em uma ampla gama de habilidades cognitivas / comportamentais foram relatados em EGCG tratada indivíduos. Curiosamente, enquanto os pais relataram habilidades melhoradas verbais cognitivas, que são menos preservadas em SD, e

considerado um dos marcos da deficiência intelectual mundial nesses indivíduos [40, 41] e um impacto significativo de melhoria cognitiva com EGCG sobre a vida cotidiana, e testes neuropsicológicos não podiam detectar esses efeitos. Essa discrepância poderia responder a uma baixa sensibilidade dos instrumentos de avaliação funcional.

Um aspecto importante foi a segurança e toxicidade, uma vez que indivíduos com SD podem ser mais sensíveis do que euploides para algum efeito adverso. EGCG demonstrou ser uma substância segura após a administração repetida em humanos. Não foi observada alteração de marcadores de função hepática (AST e ALT). Estudos em animais têm relatado EGCG para ser envolvido no ciclo redox e formação de quinona com ambas as atividades antioxidantes e pró-oxidantes e de ser capaz de induzir o stress oxidativo [42]. Não foi encontrado nenhum aumento de biomarcadores de estresse oxidativo (LDL-ox e atividade da GSH-Px), mas uma redução da oxidação lipídica em indivíduos tratados com EGCG. A melhora no estado oxidativo / antioxidante combinado com um perfil lipídico saudável, mostrado pelos colesterol e de colesterol LDL concentrações totais pode ser considerada benéfica.

Importante, como para os ratos, em humanos os resultados bioquímicos permitiram estabelecer uma relação clara entre a melhoria da memória e os níveis de homocisteína, sugerindo uma dependência direta de melhora cognitiva em atividade Dyrk1A. Além disso, após 3 meses de interrupção do tratamento com EGCG houve declínio dos efeitos cognitivos, juntamente com uma diminuição paralela dos níveis de homocisteína no plasma, sugerindo que as alterações na normalização das atividades cognitivas são induzidas por meio de mudanças neuronais temporárias. Isso é importante porque Dyrk1A tem sido relacionada com a plasticidade sináptica no cérebro que podem levar a modificações estruturais estáveis em circuitos neurais [15,16,18]. Isto tem consequências funcionais, desde problemas de aprendizagem e de memória na SD consideravelmente mais perceptível ao longo da infância e adolescência e parece estar relacionado a uma incapacidade de "estabilizar" a informação que é adquirida, um problema na consolidação da memória que é uma função do sistema hipocampal (ver [10]). Consolidação de armazenamento de informação ábil exige a tradução de eventos sinápticos bioquímicos de curta duração em mudanças funcionais e estruturais mais estáveis. Isto tem sido demonstrado em modelos de rato de trissômicos para SD e também em TgDyrk1A e propõe-se a base da estabilidade reduzida de aprendizagem no fenótipo (ver [11] para revisão). Normalizando a atividade da Dyrk1A, EGCG é, possivelmente, favorecendo a aprendizagem através desses

mecanismos, e, portanto, pode-se especular que ele poderia ser especialmente benéfico se emparelhado com intervenções que também aumentam a plasticidade, como a estimulação cognitiva.

Em conclusão, nós aqui demonstramos os efeitos positivos do EGCG na aprendizagem e déficit de memória de modelos e humanos SD, apoiando assim a investigação sobre o uso de EGCG como um potencial agente terapêutico para melhora dos déficits cognitivos em adultos jovens com SD. As concentrações plasmáticas de Hcy são propostas como um biomarcador de boa eficácia do tratamento.

Queremos agradecer a Life Extension e Dr. S. Hirsch pelo dom generoso de extratos MGTE. Agradecemos Echevarne Laboratories para a oferta generosa de análises clínicas e Fundación' Catalana S'índrome de Down (FCSD, Espanha) para a sua assistência com o recrutamento de voluntários e para a prestação de informações e orientações ao longo do estudo. Finalmente, por último, mas não menos importante, gostaria de expressar agradecimento muito especial a todos os participantes e suas famílias por seu tempo e esforços. Este trabalho foi apoiado pelo Jérôme Lejeune e Fundação de Arte Reina Sofia, o DURSI (2009SGR1313, 2009SGR718), SAF2010-16427, Fundação Koplowitz, Fundação FRAXA, CureFXS ERareEU, FIS PS09102673 e ANR-MNP (concessão DSTHER). Este trabalho foi financiado em parte pelo contrato Miguel Servet SNS (CP06/00100), Instituto de Saúde Carlos III. O CIBEROBN e CIBERER são iniciativas do Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Espanha.

Os autores declararam não haver conflito de interesse.

6 Referências

- [1] Wolfram, S., Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health. *J. Am. Coll. Nutr.* 2007, 26, 373S–388S.
- [2] Shirakami, Y., Shimizu, M., Moriwaki, H., Cancer chemoprevention with green tea catechins: from bench to bed. *Curr. Drug. Targets* 2012, 13, 1842–1857.
- [3] Steinmann, J., Buer, J., Pietschmann, T., Steinmann, E., Antiinfective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. *Br. J. Pharmacol.* 2013, 168, 1059–1073.
- [4] Kelsey, N. A., Wilkins, H. M., Linseman, D.A., Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Molecules* 2010, 15, 7792–7814.

- [5] Wang, Y., Li, M., Xu, X., Song, M. et al., Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) promotes neural progenitor cell proliferation and sonic hedgehog pathway activation during adult hippocampal neurogenesis. *Mol. Nutr. Food Res.* 2012, *56*, 1292–1303.
- [6] Guedj, F., Sebrié, C., Rivals, I., Ledru, A. et al., Green tea polyphenols rescue of brain defects induced by overexpression of DYRK1A. *PLoS One* 2009, *4*, e4606.
- [7] Megarbané, A., Ravel, A., Mircher, C., Sturtz, F. et al., The 50th anniversary of the discovery of trisomy 21: the past, present, and future of research and treatment of Down syndrome. *Genet. Med.* 2009, *11*, 611–616.
- [8] Lott, I. T., Dierssen, M., Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with Down's syndrome. *Lancet Neurol.* 2010, *9*, 623–633.
- [9] Dierssen, M., Herault, Y., Estivill, X., Aneuploidy: from a physiological mechanism of variance to Down syndrome. *Physiol. Rev.* 2009, *89*, 887–920.
- [10] Dierssen, M., Down syndrome: the brain in trisomic mode. *Nat. Rev. Neurosci.* 2012, *13*, 844–858.
- [11] Rahmani, Z., Blouin, J. L., Creau-Goldberg, N., Watkins, P. C., Mattei, J. F. et al., Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, *86*, 5958–5962.
- [12] Dahmane, N., Ghezala, G. A., Gosset, P., Chamoun, Z. et al., Transcriptional map of the 2.5-Mb CBR-ERG region of chromosome 21 involved in Down syndrome. *Genomics* 1998, *48*, 12–23.
- [13] Altafaj, X., Dierssen, M., Baamonde, C., Martí, E. et al., Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 2001, *10*, 1915–1923.
- [14] Fotaki, V., Dierssen, M., Alcantara, S., Martínez, S. et al., Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. *Mol. Cell. Biol.* 2002, *22*, 6636–6647.
- [15] Benavides-Piccione, R., Dierssen, M., Ballesteros-Yañez, I., Martínez de Lagran, M. et al., Alterations in the phenotype of neocortical pyramidal cells in the Dyrk1A^{+/-} mouse. *Neurobiol. Dis.* 2005, *20*, 115–122.
- [16] Scales, T. M., Lin, S., Kraus, M., Goold, R. G. et al., Nonprimed and DYRK1A-primed GSK3 beta-phosphorylation sites on MAP1B regulate microtubule dynamics in growing axons. *J. Cell. Sci.* 2009, *122*, 2424–2435.

- [17] Lepagnol-Bestel, A. M., Zvara, A., Maussion, G., Quignon, F. et al., DYRK1A interacts with the REST/NRSF-SWI/SNF chromatin remodelling complex to deregulate gene clusters involved in the neuronal phenotypic traits of Down syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 2009, *18*, 1405–1414.
- [18] Martinez de Lagran, M., Benavides-Piccione, R., BallesterosYanez, I., Calvo, M. et al., Dyrk1A influences neuronal morphogenesis through regulation of cytoskeletal dynamics in mammalian cortical neurons. *Cereb. Cortex* 2012, *22*, 2867–2877.
- [19] Escorihuela, R. M., Fernandez-Teruel, A., Vallina, I. F., Baa´ monde, C. et al., A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. *Neurosci. Lett.* 1995, *199*, 143–146.
- [20] Demas, G. E., Nelson, R. J., Krueger, B. K., Yarowsky, P. J., Impaired spatial working and reference memory in segmental trisomy (Ts65Dn) mice. *Behav. Brain Res.* 1998, *90*, 199–201.
- [21] Dowdy-Sanders, N. C., Wenger, G. R., Working memory in the Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome. *Behav. Brain Res.* 2006, *168*, 349–352.
- [22] Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M., Cohen, P., The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.* 2003, *371*, 199–204.
- [23] Reeves, R. H., Irving, N. G., Moran, T. H., Wohn, A., Kitt, C. et al., A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat. Genet.* 1995, *11*, 177–184.
- [24] Toiber, D., Azkona, G., Ben-Ari, S., Toran, N. et al., En´ gineering DYRK1A overdosage yields Down syndromecharacteristic cortical splicing aberrations. *Neurobiol. Dis.* 2010, *40*, 348–359.
- [25] Braudeau, J., Delatour, B., Duchon, A., Pereira, P. L. et al., Specific targeting of the GABA-A receptor alpha5 subtype by a selective inverse agonist restores cognitive deficits in Down syndrome mice. *J. Psychopharmacol.* 2011, *25*, 1030–1042.
- [26] Papadopoulos, C., Arato, K., Lilienthal, E., Zerweck, J. et al., Splice variants of the dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 4 (DYRK4) differ in their subcellular localization and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 2011, *286*, 5494–5505.
- [27] Noll, C., Planque, C., Ripoll, C., Guedj, F. et al., DYRK1A, a novel determinant of the methionine-homocysteine cycle in different mouse models overexpressing this Down-syndrome-associated kinase. *PLoS One* 2009, *4*, e7540.

- [28] Fortin, L. J., Genest, J, Jr., Measurement of homocyst(e)ine in the prediction of arteriosclerosis. *Clin. Biochem.* 1995, 28, 155–162.
- [29] Varga P, Volah A, Ol' ah E., Biochemical alterations in patients' with Down syndrome. *Orv. Hetil.* 2008, 149, 1203–1213.
- [30] Ortiz-Abalia, J., Sahun, I., Altafaj, X., Andreu, N. et al., Target- ing Dyrk1A with AAVshRNA attenuates motor alterations in TgDyrk1A, a mouse model of Down syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 2008, 83, 479–488.
- [31] Altafaj, X., Mart' in, E. D., Ortiz-Abalia, J., Valderrama, A. et al., Normalization of Dyrk1A expression by AAV2/1-shDyrk1A attenuates hippocampal-dependent defects in the Ts65Dn Down syndrome mouse model. *Neurobiol. Dis.* 2013, 52, 117–27.
- [32] Meunier, M., Bachevalier, J., Mishkin, M., Murray, E. A., Effects on visual recognition of combined and separate ablations of the entorhinal and perirhinal cortex in rhesus monkeys. *J. Neurosci.* 1993, 13, 5418–5432.
- [33] Winters, B. D., Forwood, S. E., Cowell, R. A., Saksida, L. M. et al., Double dissociation between the effects of periposthinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *J. Neurosci.* 2004, 24, 5901–5908.
- [34] Vicari, S., Bellucci, S., Carlesimo, G. A., Visual and spatial long-term memory: differential pattern of impairments in Williams and Down syndromes. *Dev. Med. Child. Neurol.* 2005, 47, 305–311.
- [35] Buffalo, E. A., Bellgowan, P. S., Martin, A., Distinct roles for medial temporal lobe structures in memory for objects and their locations. *Learn. Mem.* 2006, 13, 638–643.
- [36] Pinter, J. D., Brown, W. E., Eliez, S., Schmitt, J. E. et al., Amygdala and hippocampal volumes in children with Down syndrome: a high-resolution MRI study. *Neurology* 2001, 56, 972–974.
- [37] Bachevalier, J., Mishkin, M., Visual recognition impairment follows ventromedial but not dorsolateral prefrontal lesions in monkeys. *Behav. Brain. Res.* 1986, 20, 249–261.
- [38] Turriziani P, Oliveri M, Salerno S, Costanzo F et al., Recognition memory and prefrontal cortex: dissociating recollection and familiarity processes using rTMS. *Behav. Neurol.* 2008, 19, 23–27.
- [39] Mottaghy, F. M., Gangitano, M., Sparing, R., Krause, B. J. et al., Segregation of areas related to visual working memory in the prefrontal cortex revealed by rTMS. *Cereb. Cortex* 2002, 12, 369–375.
- [40] Brock, J., Jarrold, C., Serial order reconstruction in Down syndrome: evidence for a selective deficit in verbal shortterm memory. *J. Child. Psychol. Psychiatry* 2005, 46, 304–316.

- [41] Frenkel, S., Bourdin, B., Verbal, visual, and spatio-sequential short-term memory: assessment of the storage capacities of children and teenagers with Down's syndrome. *J. Intellect. Disabil. Res.* 2009, 53, 152–160.
- [42] Sang, S., Hou, Z., Lambert, J. D., Yang, C. S., Redox properties of tea polyphenols and related biological activities. *Antioxid. Redox. Signal* 2005, 7, 1704–1714.

Figuras e tabelas:

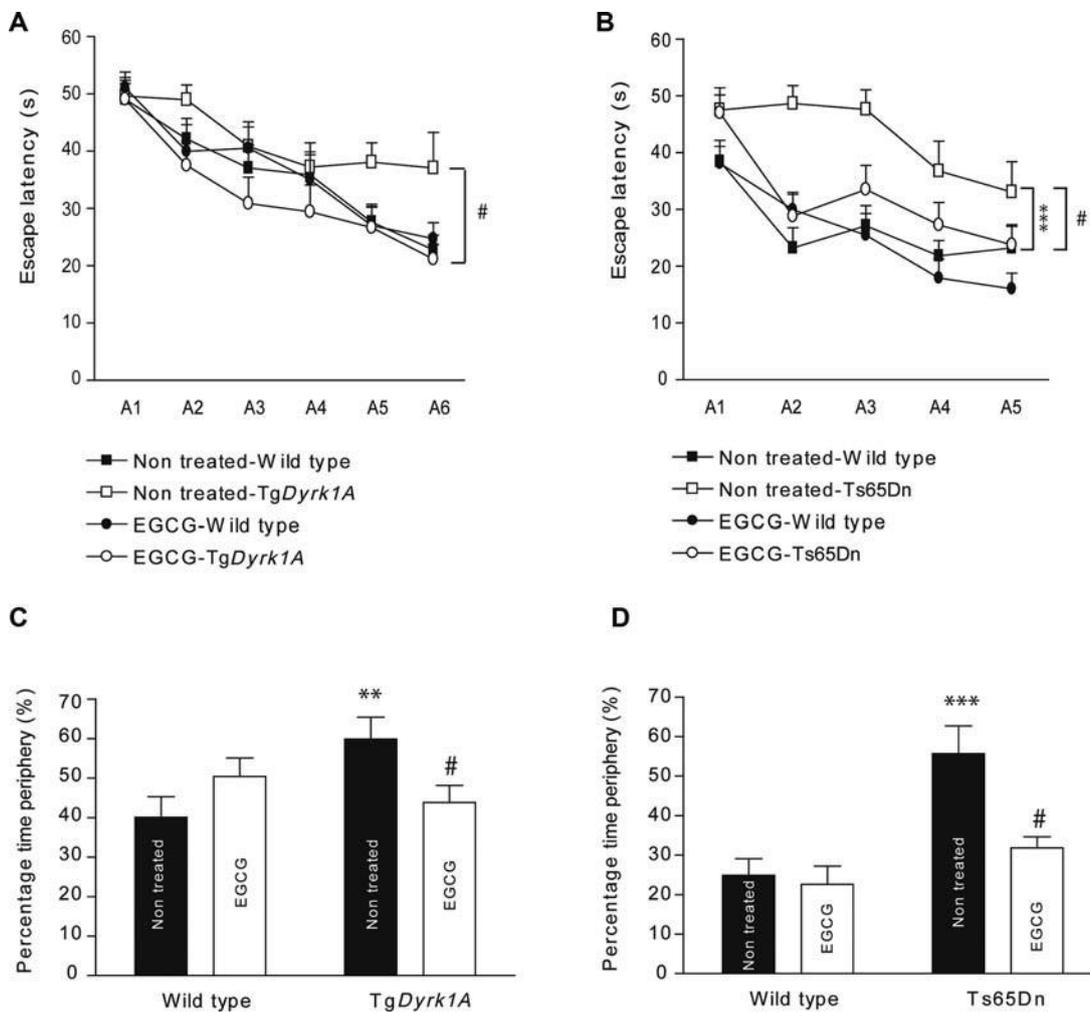


Figura 1

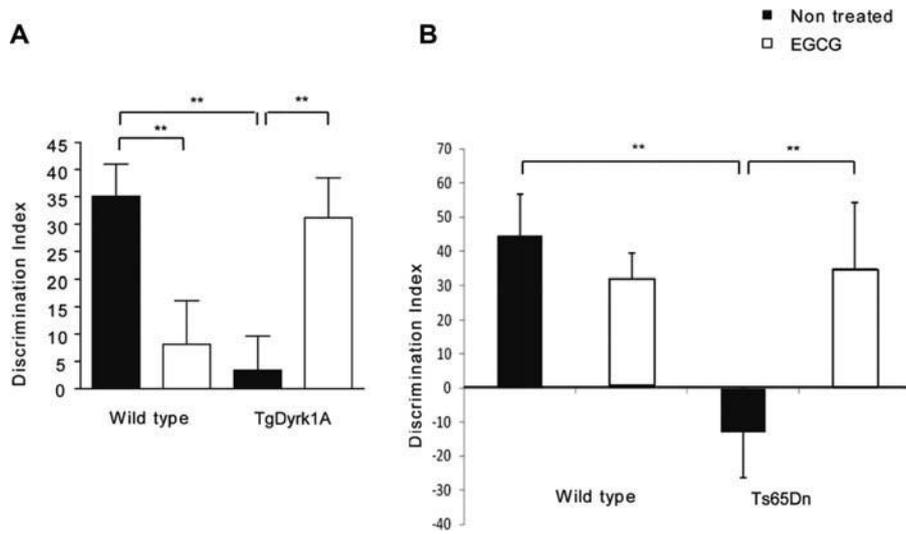


Figura 2

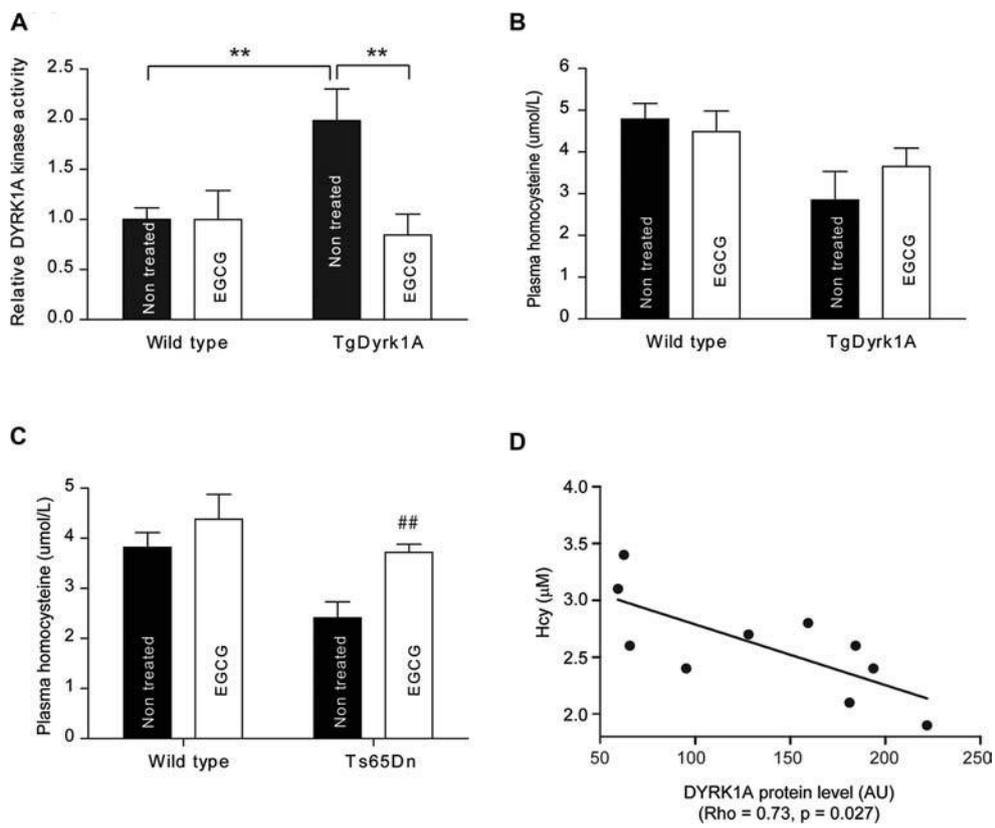
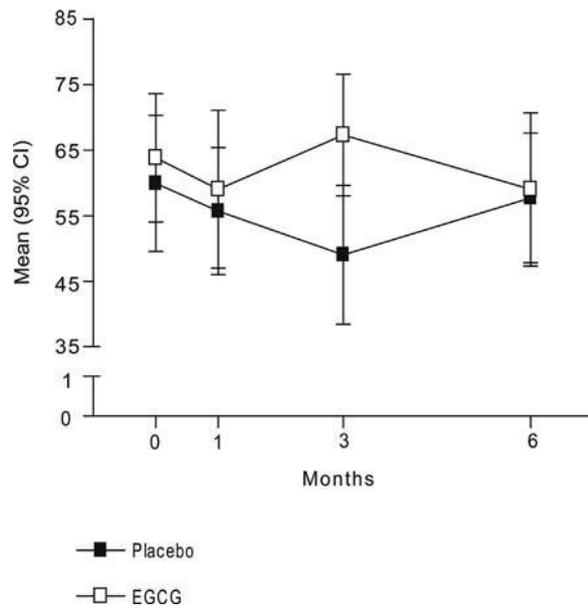


Figura 3

Table 1. Sociodemographic characteristics and clinical parameters at baseline

	EGCG	Placebo
	(n= 13)	(n= 16)
Age	22.2 (4.2)	20.6 (2.2)
Sex Female	6 (46.2%)	8 (50.0%)
Male	7 (53.8%)	8 (50.0%)
Education (years)	14.86 (2.6)	15.38 (2.4)
Intellectual disability level		
Mild/Moderate	8 (61.5%)	5 (31.2%)
Severe	5 (38.5%)	11 (68.7%)
Intellectual quotient (IQ) K-BIT (standardized score)	45.9 (7.8)	42.4 (6.4)
DS genetic variations		
Trisomy 21	10 (76.9%)	11 (68.7%)
Mosaic	0	1 (6.2%)
Translocation	1 (7.6%)	0
Unknown	2 (15.3%)	4 (25.0%)
Weight	60.1 (13.3)	56 (10.9)
Body Mass Index (BMI)	25.4 (4.0)	23.2 (3.8)

Results are presented as mean (SD) for continuous variables and absolute frequency (relative frequency) for categorical variables.

**Figura 4**