

Evaluación preliminar de la relevancia del número de copias de ADN mitocondrial en la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

Luis E. Almaguer Mederos^{1*}
Dennis Almaguer Gotay¹
Raúl Aguilera Rodríguez¹
Daniel O. Palenzuela²
Dany Cuello Almarales¹
Annelié Estupiñán Rodríguez¹
Maikol Jesús Cintra Gómez³
Geanny Sánchez Ochoa³

¹ Centro para la Investigación y Rehabilitación de Ataxias Hereditarias, Holguín, Cuba

² Centro de Investigaciones Biológicas. La Habana, Cuba

³ Universidad de Ciencias Médicas de Holguín. Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas. Holguín, Cuba

*lalmaguermederos@gmail.com

Resumen:

Introducción: La Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 (SCA2) es una enfermedad neurodegenerativa causada por la expansión de una secuencia repetitiva de CAG en el gen *ATXN2*. Se han identificado varios factores candidatos a modificadores genéticos de la enfermedad. Se desconoce la relevancia del número de copias del ADNmt para la SCA2.

Objetivo: Evaluar la relevancia del número de copias del ADN mitocondrial como potencial biomarcador de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.

Métodos: Se realizó un estudio de casos-controles en el que fueron incluidos pacientes con diagnóstico clínico y molecular de SCA2, presintomáticos portadores de la mutación causante de la enfermedad y controles sanos pareados por sexo y edad con los pacientes enfermos y presintomáticos. Se obtuvo información clínica de los pacientes, mientras que la cuantificación del número de copias de ADNmt se realizó por medio de PCR cuantitativa en tiempo real.

Resultados: No se obtuvieron correlaciones significativas entre el número de copias de ADNmt y la edad de los individuos incluidos en el estudio. De modo similar, no se obtuvieron diferencias significativas para el número de copias de ADNmt entre individuos de género masculino o femenino. Adicionalmente, no hubo diferencias significativas entre pacientes, presintomáticos y controles en cuanto al número de copias de ADNmt.

Conclusiones: El número de copias del ADN mitocondrial parece no ser relevante como marcador de la gravedad y progresión clínica de la enfermedad en portadores de la mutación causante de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. Se requieren estudios adicionales en muestras más extensas para verificar estos resultados.

Palabras clave: ADN mitocondrial, Ataxia Espinocerebelosa tipo 2, biomarcador, gravedad clínica.

I. INTRODUCCIÓN

La Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 (SCA2) es una Ataxia Cerebelosa Autosómico Dominante perteneciente al grupo I de la clasificación de Anita Harding, causada por la expansión de una secuencia repetitiva de CAG en la región codificadora del gen *ATXN2*. Esta última característica la ubica junto a la enfermedad de Huntington (HD, del inglés: Huntington's disease), la Atrofia Muscular Espinobulbar (SBMA, del inglés: Spinal and Bulbar Muscular Atrophy), la Atrofia Dentatorubral-Pálidolusiana (DRPLA, del inglés: Dentatorubral pallidolusian atrophy) y a las Ataxias Espinocerebelosas (SCA) tipo 1, tipo 3 -o enfermedad de Machado-Joseph (MJD, del inglés: Machado-Joseph disease)-, tipo 6, tipo 7 y tipo 17, en el grupo de enfermedades poliglutamínicas humanas (1). Estudios epidemiológicos indican que la SCA2 es la segunda entre las ataxias espinocerebelosas con mayor frecuencia a nivel mundial. La SCA2 representa el 15% de todas las SCA y el 33% de las SCA debidas a expansiones de secuencias repetitivas de CAG, alcanzando las más elevadas tasas de incidencia y prevalencia en la provincia Holguín, Cuba (2).

El número de repeticiones de CAG en los alelos *ATXN2* expandidos es el factor genético con mayor influencia sobre el fenotipo clínico de la enfermedad, incluyendo la presencia de distonía y mioquimia, la disminución de la velocidad sacádica ocular y la puntuación total de ataxia (3, 4). Existe una correlación entre la edad de inicio de la enfermedad y el número de repeticiones de CAG en los alelos *ATXN2* expandidos, que explica entre el 47 y 80% de la variabilidad de la edad de inicio (5, 6).

Entre los mecanismos fisiopatológicos asociados a la SCA2 se relacionan la formación aberrante de agregados intracelulares con el secuestro concomitante de proteínas de la fisiología celular, la dishomeostasis del calcio y el estrés oxidativo (1). En particular, varias evidencias apuntan a la existencia de desbalance redox en pacientes con SCA2, si bien parecen tener consecuencias clínicas limitadas (7). Sin embargo, en el contexto de las enfermedades poliglutamínicas se ha demostrado la existencia de una asociación entre los niveles de estrés oxidativo en sangre y el número de copias del ADN mitocondrial (ADNmt) en leucocitos (8), con repercusiones clínicas de importancia en algunos casos.

Aun cuando se han identificado varios factores genéticos como modificadores de marcadores de gravedad clínica de la SCA2 (9-11), se desconoce la relación entre el número de copias del ADNmt y la gravedad clínica de la SCA2, así como el rol de este factores en la fisiopatología de la enfermedad. En consecuencia, en la presente investigación se pretende evaluar la relevancia del número de copias del ADN mitocondrial como marcador de la gravedad y progresión clínica de la enfermedad en portadores de la mutación causante de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.

II. MÉTODO

Se realizó un estudio de casos-controles en el que fueron incluidos 40 pacientes con diagnóstico clínico y molecular de SCA2 y 39 individuos presintomáticos portadores de la mutación causante de la enfermedad, evaluados en el Centro para la Investigación y Rehabilitación de Ataxias Hereditarias. También fueron incluidos 42 individuos sanos (controles) pareados por sexo y edad con los pacientes enfermos y presintomáticos.

Cada individuo fue interrogado en busca de síntomas de compromiso del Sistema Nervioso Central o Periférico y posteriormente se le realizó un examen neurológico completo según la metodología establecida por la Clínica Mayo (12). El diagnóstico clínico de SCA2 se basó en la presencia de ataxia cerebelosa, disartria, dismetría, disdiadococinesia, disfagia y enlentecimiento de los movimientos oculares

sacádicos. Para la cuantificación de la severidad de las alteraciones neurológicas, se aplicó la Escala para la Evaluación de la Ataxia (SARA, por sus siglas en inglés) (13).

Se obtuvo ADN a partir de 10 ml de sangre periférica de cada paciente, siguiendo procedimientos estandarizados (14). La cuantificación de la concentración y pureza del ADN fue realizada en un micro-analizador Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). Para determinar la concentración se obtuvo la absorbancia de la muestra a 260nm y para determinar la pureza se utilizó la proporción de las absorbancias obtenidas a 260 nm y 280 nm (260 nm/280 nm). Se consideró como ADN con un buen nivel de pureza, cuando dicho valor esté entre 1,5 y 2,0 según lo previamente reportado (14). La cuantificación del número de copias de ADNmt se realizó por medio de PCR cuantitativa en tiempo real siguiendo procedimientos previamente reportados (15).

El comportamiento de las distintas variables consideradas en el estudio fue descrito utilizando estadígrafos generales de tendencia central y de dispersión: media, moda, mínimo, máximo y desviación estándar. Se realizaron análisis de correlación para evaluar la asociación entre el número de copias de ADNmt y marcadores del fenotipo clínico de la enfermedad. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software SPSS (versión 27.0). La investigación fue realizada en correspondencia con las regulaciones establecidas en la última versión de las declaraciones de Helsinki (Fortaleza, Brasil, 2013). Se obtuvo el consentimiento informado de todos los individuos incluidos en el estudio.

III. RESULTADOS

En la tabla 1 se muestra la estadística descriptiva de las variables incluidas en el estudio. Como expresión de la adecuada conformación de los grupos de comparación, no se obtuvieron diferencias significativas entre estos para la distribución del género ($\chi^2=3,089$; $p=0,213$) o la edad ($F=1,943$; $p=0,157$).

Tabla 1 Estadística descriptiva para las variables consideradas en el estudio según grupos de comparación.

Variable	Controles (n=42)	Presintomáticos (n=39)	Enfermos (n=40)
Género (masc./femen.)	10/32	10/29	14/26
Edad (años)	39,62 (10,86)	38,74 (11,42)	40,22 (12,22)
Número de copias de ADN mitocondrial	7,76 (11,69)	8,06 (11,08)	7,41 (9,67)
CAGexp	-	36,26 (2,37)	39,94 (5,08)
Edad de Inicio (años)	-	-	32,77 (12,18)
Puntuaciones SARA	-	-	16,93 (5,14)
Duración de la enfermedad (años)	-	-	10,25 (6,89)

No se obtuvieron correlaciones significativas entre el número de copias de ADNmt y la edad de los individuos incluidos en el estudio ($r=0,166$; $p=0,081$). De modo similar, no se obtuvieron diferencias significativas para el número de copias de ADNmt entre individuos de género masculino o femenino

($t=-1,242$; $p=0,217$). Adicionalmente, no hubo diferencias significativas entre los grupos de comparación según el número de copias de ADNmt (Figura 1).

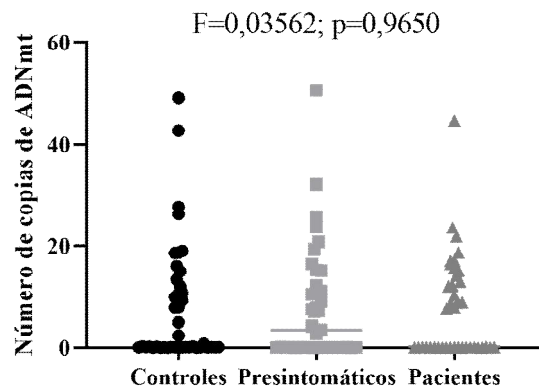


Figura 1. Distribución del número de copias de ADNmt según los grupos de comparación.

Estos resultados contradicen otros previamente obtenidos en una muestra reducida de pacientes con SCA2, en los que se obtuvo una disminución significativa del número de copias de ADNmt en relación a individuos controles (16). En ese estudio inicial también se obtuvieron disminuciones significativas del número de copias de ADNmt en pacientes con SCA3, HD o SBMA en relación a individuos controles; los pacientes con menor número de copias de ADNmt manifestaron con mayor frecuencia enfermedades con múltiples síntomas y tuvieron mayor número de repeticiones de CAG en sus alelos mutantes, sugiriendo que el número de copias de ADNmt podría ser de utilidad como biomarcador de la gravedad de la presentación clínica de enfermedades poliglutamínicas (16). Sin embargo, los resultados relativos a la asociación entre el número de copias de ADNmt y enfermedades poliglutamínicas son variables y parecen depender del tipo celular estudiado, entre otros factores. Así, en leucocitos de pacientes con HD se ha reportado la ocurrencia de incrementos (17, 18) o decrementos (16, 19) en el número de copias de ADNmt, mientras que en fibroblastos de pacientes con HD se ha reportado de modo consistente la ocurrencia de disminución en el número de copias de ADNmt (18, 20). Mientras tanto, en pacientes con SCA3 se ha reportado de modo consistente, la no existencia de diferencias significativas en el número de copias del ADNmt entre pacientes y controles (15, 21).

Adicionalmente, el empleo de diferentes metodologías para la cuantificación del número de copias del ADNmt dificulta la comparación de los resultados entre diferentes estudios. Otros factores que pudieran contribuir a explicar la inconsistencia de los resultados obtenidos en relación a la variabilidad y significación clínica del número de copias del ADNmt en el contexto de enfermedades poliglutamínicas, pudieran estar relacionados con la estratificación de las poblaciones estudiadas para factores no considerados en las investigaciones realizadas, o con la falta de potencia estadística derivada del estudio de muestras limitadas.

IV. CONCLUSIONES

El número de copias del ADN mitocondrial parece no ser relevante como marcador de la gravedad y progresión clínica de la enfermedad en portadores de la mutación causante de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. Se requieren estudios adicionales en muestras más extensas para verificar estos resultados.

REFERENCIAS

1. Paulson HL, Shakkottai VG, Clark HB, Orr HT. Polyglutamine spinocerebellar ataxias - from genes to potential treatments. *Nat Rev Neurosci*. 2017; 18(10):613-626.
2. Scott SSO, Pedrosa JL, Barsottini OGP, França-Junior MC, Braga-Neto P. Natural history and epidemiology of the spinocerebellar ataxias: Insights from the first description to nowadays. *J Neurol Sci*. 2020; 417:117082.
3. Seifried C, Velázquez-Pérez L, Santos-Falcón N, Abele M, Ziemann U, et al. Saccade velocity as a surrogate disease marker in spinocerebellar ataxia type 2. *Ann NY Acad Sci*. 2005; 1039: 524-7.
4. Netravathi M, Pal PK, Purushottam M, Thennarasu K, Mukherjee M, Jain S. Spinocerebellar ataxias types 1, 2 and 3: Age adjusted clinical severity of disease at presentation correlates with size of CAG repeat lengths. *J Neurol Sci*. 2009; 277(1-2):83-6.
5. Almaguer-Mederos LE, NS Falcon, YR Almira, YG Zaldivar, DC Almarales, EM Góngora, et al. Estimation of the age at onset in spinocerebellar ataxia type 2 Cuban patients by survival analysis. *Clin Genet*. 2010; 78:169-174.
6. Tezenas DMS, Durr A, Rakowicz M, Nanetti L, Charles P, Sulek A, et al. Prediction of the age at onset in spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3 and 6. *J Med Genet*. 2014a; 51(7):479-86.
7. Almaguer-Gotay D, Almaguer-Mederos LE, Rodríguez-Aguilera R, Rodríguez-Labrada R, Velázquez-Pérez L, Cuello-Almarales D, et al. Redox Imbalance Associates with Clinical Worsening in Spinocerebellar Ataxia Type 2. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2021: 9875639.
8. Liu CS, Tsai CS, Kuo CL, Chen HW, Lii CK, Ma YS, Wei YH. Oxidative stress-related alteration of the copy number of mitochondrial DNA in human leukocytes. *Free Radic Res*. 2003; 37(12):1307-17.
9. Almaguer-Mederos LE, Aguilera-Rodríguez R, Cuello-Almarales D, Almaguer-Gotay D, González-Zaldívar Y, Vázquez-Mojena Y, et al. Normal ATXN2 allele's influences on the age at onset in Spinocerebellar Ataxia type 2. *Mov Dis*. 2017a; 32(9):1329-1330.
10. Almaguer-Mederos LE, Almaguer-Gotay D, Aguilera-Rodríguez R, et al. Association of glutathione S-transferase omega polymorphism and spinocerebellar ataxia type 2. *J Neurol Sci* 2017b; 372: 324-328.
11. Almaguer-Mederos LE, Jorge-Sainz Y, Almaguer-Gotay D, Aguilera-Rodríguez R, Rodríguez-Labrada R, Velázquez-Pérez L, et al. One-carbon metabolism factor MTHFR variant is associated with saccade latency in Spinocerebellar Ataxia type 2. *Journal of the Neurological Sciences* 2020; 409: 116586.
12. Ropper AH, Brown RH. Principles of neurology. 10th edition. McGraw-Hill Companies, Inc., New York; 2010.
13. Schmitz-Hübsch T, du Montcel ST, Baliko L, Berciano J, et al. Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology*. 2006; 66:1717-1720.

14. Sambrook J, MacCallum P, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2011.
15. Raposo M, Ramos A, Santos C, Kazachkova N, Teixeira B, Bettencourt C, et al. Accumulation of mitochondrial DNA common deletion since the preataxic stage of Machado-Joseph disease. *Molecular Neurobiology* 2019; 56(1):119-124.
16. Liu C-S, Cheng W-L, Kuo S-J, Li J-Y, Soong B-W, Wei Y-H. Depletion of mitochondrial DNA in leukocytes of patients with poly-Q diseases. *Journal of the Neurological Sciences* 2008; 264: 18-21.
17. Chen C-M, Wu Y-R, Cheng M-L, et al. Increased oxidative damage and mitochondrial abnormalities in the peripheral blood of Huntington's disease patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 359:335-340.
18. Jedrak P, Krygier M, Tonska K, Drozd M, Kaliszewska M, Bartnik E, et al. Mitochondrial DNA levels in Huntington disease leukocytes and dermal fibroblasts. *Metab Brain Dis*. 2017; 32(4):1237-1247.
19. Petersen MH, Budtz-Jorgensen E, Sorensen SA, Nielsen JE, Hjermand LE, Vinther-Jensen T, et al. Reduction in mitochondrial DNA copy number in peripheral leukocytes after onset of Huntington's disease. *Mitochondrion* 2014; 17:14-21.
20. Siddiqui A, Rivera-Sánchez S, Castro MR, Acevedo-Torres K, Ranea A, Torres-Ramos CA, et al. Mitochondrial DNA damage is associated with reduced mitochondrial bioenergetics in Huntington's disease. *Free Radic Biol Med*. 2012; 53(7): 1478-1488.
21. Zeng A, Liu X, Shen L, Li W, Ding Z, Bai Y, et al. Analysis of mitochondrial DNA variations in a Chinese family with spinocerebellar ataxia. *Journal of Clinical Neuroscience* 2012; 19: 60-64.