



**XI JORNADA CIENTÍFICA PROVINCIAL DEL
CAPÍTULO DE LA SOCIEDAD DE GENÉTICA
HUMANA Y MÉDICA DE HOLGUÍN, 2023**

**ANOMALÍAS NUCLEARES Y POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS A
PACIENTES CON ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO-2**

Dany A. Cuello-Almarales¹, <http://orcid.org/0000-0001-9293-414X>

Luis E. Almaguer-Mederos², <http://orcid.org/0000-0003-0887-2359>

Dennis Almaguer Gotay³, <https://orcid.org/0000-0002-2573-1825>

Imilsi Delfino Morales⁴

¹ MSc, Profesor Asistente e Investigador Auxiliar, Centro para la Investigación y Rehabilitación de las Ataxias hereditarias (CIRAH), Holguín, Cuba.

² DrC, Profesos e Investigador Titular, Centro para la Investigación y Rehabilitación de las Ataxias hereditarias (CIRAH), Holguín, Cuba.

³ MSc, Investigador Auxiliar, Centro para la Investigación y Rehabilitación de las Ataxias hereditarias (CIRAH), Holguín, Cuba.

⁴ Lic. en Biología, Investigadora en Centro de Genética Toxicológica. Santiago de Cuba, Cuba.

E-mail: cuellodany@gmail.com

Resumen

Introducción. La identificación de biomarcadores para la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 (SCA2) es un tema de importancia y actualidad.

Objetivo. Caracterizar la asociación entre atipias nucleares y la SCA2, y la potencial contribución de los polimorfismos *GSTO2* [rs2297235] y *MTHFR* [C677T].

Métodos. Se estudiaron 30 pacientes SCA2 y 30 sujetos sanos pareados por sexo y edad. Los polimorfismos *GSTO2* [rs2297235] y *MTHFR* [C677T] fueron determinados por PCR/RFLP. Se determinó la frecuencia de atipias nucleares en células exfoliadas de la mucosa bucal.

Resultados. La frecuencia de células con micronúcleos, picnosis y cariólisis tuvo una asociación altamente significativa con la SCA2 ($p < 0.01$). La frecuencia de células binucleadas estuvo significativamente asociada a la edad de inicio, y fue influida

por la duración de la enfermedad ($p < 0,05$). El polimorfismo *GSTO2* [rs2297235] influyó significativamente sobre la edad de inicio, pero no sobre la frecuencia de micronúcleos. **Conclusiones.** La presencia de atipias nucleares en células exfoliadas de la mucosa bucal está asociada a la SCA2, aunque no parece ser influido por la edad, sexo, número de repeticiones de CAG en alelos *ATXN2* o por los polimorfismos *GSTO2* [rs2297235] o *MTHFR* [C677T].

Palabras claves: anomalías nucleares, SCA2, polimorfismos, micronucleos

Introducción

La Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 (SCA2) alcanza la más elevada tasa de prevalencia a nivel mundial en la provincia Holguín: 40,18 cada 105 habitantes.¹ La SCA2 es la segunda entre las SCA con mayor prevalencia a nivel mundial, y es la más frecuente en el centro y sur de Italia,² en el norte de Europa,³ en la India,⁴ y en Singapur,⁵ si bien en estas regiones alcanza tasas de prevalencia mucho menores que en Holguín. La SCA2 es causada por la expansión de una secuencia repetitiva de CAG localizada en el primer exón del gen *ATXN2*. Aun cuando el número de repeticiones de CAG en el gen *ATXN2* es el principal determinante genético de la gravedad clínica en la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 (SCA2), el fenotipo clínico es muy variable incluso entre individuos con igual número de repeticiones de CAG en sus alelos expandidos.⁶ Estas observaciones sugieren la existencia de factores genéticos, fisiológicos y del ambiente externo, adicionales al número de repeticiones de CAG en los alelos *ATXN2* expandidos que, en interacción, modifican el fenotipo clínico de la enfermedad. La identificación de nuevos factores fisiológicos con influencia sobre el fenotipo clínico de la enfermedad tiene gran importancia para el desarrollo de modelos predictivos, para la mejor comprensión de los mecanismos moleculares implicados en el proceso patológico, y para la identificación de dianas farmacológicas y la proposición de estrategias terapéuticas. Adicionalmente, estos factores pudieran emplearse como bio-marcadores, útiles para el diagnóstico o pronóstico de la enfermedad y para el monitoreo de potenciales

intervenciones terapéuticas.⁷ Estudios recientes han sugerido la posibilidad de que procesos de inestabilidad genómica estén entre las causas fundamentales de varias enfermedades neurodegenerativas comunes y de la enfermedad de Huntington.⁸⁻¹⁰ Dada la comunidad de características entre las diferentes enfermedades poliglutamínicas se ha sugerido la existencia de mecanismos patogénicos comunes,¹¹ entre los cuales la inestabilidad genómica podría tener un rol relevante. Las atipias nucleares constituyen los marcadores de inestabilidad genómica más ampliamente utilizados en estos estudios, particularmente los micronúcleos. Los micronúcleos constituyen masas de cromatina citoplasmática con la apariencia de un pequeño núcleo que se origina de fragmentos cromosómicos o cromosomas completos, que se retrasan durante el periodo de anafase de la división celular.¹² Esta anomalía nuclear se ha asociado a factores genéticos, entre los que se encuentran polimorfismos en los genes que codifican para enzimas como las glutatión-S-transferasas (GST, por sus siglas en inglés) y la metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR, por sus siglas en inglés), implicadas funcionalmente en el control del balance oxidativo y en rutas de metilación del ADN, respectivamente.¹³

Objetivo

Caracterizar la asociación entre la frecuencia de atipias nucleares en células exfoliadas de la mucosa bucal y la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2, así como la potencial contribución de los polimorfismos genéticos *GSTO2* [rs2297235] y *MTHFR* [C677T].

Materiales y métodos

Se realizó un estudio de casos y controles en el que se incluyeron 30 individuos afectados por la SCA2 y 30 sujetos sanos pareados por sexo y edad con los enfermos. Debido a la asociación demostrada con la frecuencia de micronúcleos, fueron excluidos en ambos grupos los individuos con historia de cáncer o enfermedades cardiovasculares, así como aquellos bajo terapia anti-folato o con tratamiento anti-cáncer o con hábitos de alcoholismo o tabaquismo, o expuestos a carcinógenos químicos o radiaciones en los últimos meses. También fueron

excluidos aquellos individuos con otras enfermedades neurodegenerativas diferentes a la SCA2. Cada individuo fue interrogado en busca de síntomas de compromiso del Sistema Nervioso Central o periférico, y luego se les realizó un examen neurológico según la metodología establecida por la Clínica Mayo.¹⁴ El diagnóstico clínico de SCA2 se basó en la presencia de ataxia cerebelosa, disartria, dismetría, disdiadococinesia, disfagia y enlentecimiento de los movimientos oculares sacádicos. El número de repeticiones de CAG en alelos *ATXN2* expandidos fue determinado por medio de PCR y posterior electroforesis de ADN en geles de poliacrilamida y análisis automático de fragmentos de ADN, como fuera previamente reportado.¹

Los polimorfismos *GSTO2* [rs2297235] y *MTHFR* [C677T] fueron genotipados por medio de PCR/RFLP según protocolos estandarizados.^{15,16} Las atipias nucleares fueron estudiadas en células exfoliadas de la mucosa bucal. Para la identificación de micronúcleos, binucleación, cariólisis, picnosis y cromatina condensada, se siguieron criterios previamente establecidos.¹² Se aplicaron técnicas de estadística descriptiva e inferencial para la descripción de las variables incluidas en el estudio y para la caracterización de sus interrelaciones. El cálculo de potenciales desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg para los polimorfismos *GSTO2* [rs2297235] y *MTHFR* [C677T] se realizaron con el uso del software Genetic Data Analysis (GDA) (versión 1,0). Todas las pruebas de estadística inferencial fueron de dos colas, y se definió el nivel de significación estadística como $p < 0.05$. Se empleó el software SPSS (versión 20,0) para todos los análisis estadísticos.¹⁷

Resultados y discusión

En los pacientes SCA2 la frecuencia de micronúcleos tuvo una media (D.E) de 7,95 (3,73), mientras que entre los sujetos controles tuvo una media (D.E) de 3,27 (2,45) ($p < 0.01$). Como promedio, la frecuencia de micronúcleos entre los individuos enfermos fue 2,43 veces la encontrada entre los sujetos controles, significando un incremento del 58,9% (Figura 1-A). Un incremento similar en la frecuencia de células con micronúcleos se ha reportado a partir del estudio de

cultivos de fibroblastos derivados de ratones transgénicos modelos de la enfermedad de Huntington o de un paciente con enfermedad de Huntington de inicio juvenil.¹⁰ Esta observación sugiere que el incremento en la frecuencia de células con micronúcleos podría estar asociado al proceso patológico característico de las enfermedades poliglutámicas. Con respecto a la frecuencia de células con picnosis, en el presente estudio se obtuvo que entre los individuos afectados tuvo una media (D.E) de 24,11(17,25), mientras que entre los sujetos controles tuvo una media (D.E) de 9,02(4,64) ($p < 0.01$). Como promedio, la frecuencia de células con picnosis entre los individuos enfermos fue 2,67 veces la encontrada entre los sujetos controles, significando un incremento del 62,6% (Figura 1-B). Por otra parte, se obtuvo una media (D.E) de 5,22(4,69) para la frecuencia de células con cariólisis entre los individuos enfermos, mientras que para los sujetos controles se obtuvo una media (D.E) de 2,79(4,13) ($p < 0.01$). Como promedio, la frecuencia de células con cariólisis entre los individuos enfermos fue 1,87 veces la encontrada entre los sujetos controles, significando un incremento del 46,6% (Figura 1-C).

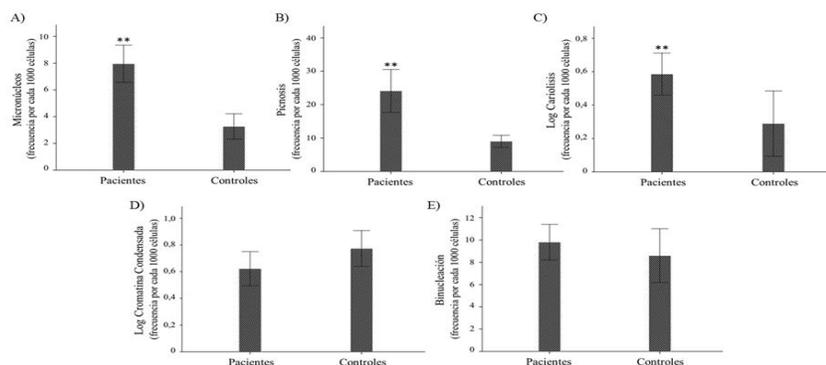


Figura 1. Comparación de la frecuencia de atipias nucleares entre pacientes y controles. ** $p < 0,01$.

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los individuos afectados y los sujetos controles en cuanto a la frecuencia de células con cromatina condensada (Figura 1-D) o binucleadas (Figura 1-E). La frecuencia de células binucleadas tuvo una media (D.E) de 9,81(4,29) entre los individuos

enfermos y una de 8,60(6,24) entre los controles. En cuanto a la frecuencia de células con cromatina condensada, se obtuvo una media (D.E) de 5,58(4,94) entre los individuos enfermos y una de 7,49(5,71) entre los sujetos sanos; se trata de la única atipia nuclear con una menor frecuencia en los individuos afectados con respecto a los sujetos controles. Estos resultados coinciden con la significativa reducción en la frecuencia de células con cromatina condensada encontrada en individuos con la enfermedad de Alzheimer en comparación con sujetos controles.⁹ De modo general, estos resultados sugieren que hay un incremento en el daño al ADN y en la muerte celular asociados a la SCA2, mientras que no hay defectos significativos en la citocinesis. En la muestra estudiada de individuos afectados por la SCA2 y sujetos controles, ni la edad ni el sexo del individuo tuvieron influencia significativa sobre la frecuencia de ninguna de las atipias nucleares estudiadas ($p>0,05$). De modo similar, el número de repeticiones de CAG en alelos *ATXN2* expandidos no mostró correlación significativa con la frecuencia de ninguna de las atipias nucleares incluidas en el estudio ($p>0,05$). Este resultado sugiere que las atipias nucleares no constituyen biomarcadores cercanamente asociados a los mecanismos fisiopatológicos primarios de la enfermedad. No obstante, la frecuencia de células binucleadas estuvo significativamente correlacionada con la edad de inicio de la enfermedad ($r=-0,374$; $p=0,049$). Adicionalmente, la duración de la enfermedad tuvo una correlación altamente significativa con la frecuencia de células binucleadas ($r=0,62$; $p<0,001$), y de células con cromatina condensada ($r=-0,40$; $p=0,017$). Las células binucleadas son indicadores de trastornos en la citocinesis, lo que implica un fallo en el ensamblaje de filamentos de actina y miosina para la formación del anillo contráctil que garantiza la citocinesis que sigue a la división nuclear en la capa de células basales en la mucosa bucal.^{12,18} Un estudio previo realizado en un modelo para la SCA2 en *Drosophila melanogaster* mostró que la ataxina-2 es un regulador sensible a la dosis de la formación de filamentos de actina.¹⁹ Adicionalmente, la pérdida de la estructura dendrítica dependiente del citoesqueleto de actina representa un evento

temprano en el proceso patológico de la SCA2.²⁰ Tomando en cuenta estas evidencias, el incremento de la frecuencia observada en las células binucleadas con el avance de la duración de la enfermedad en individuos afectados, podría deberse a la prolongada exposición a los efectos tóxicos acumulativos de la ataxina-2 mutante. En este contexto, la frecuencia de células binucleadas podría ser un marcador útil de progresión de la enfermedad. Adicionalmente, como los filamentos de actina también son parte de las estructuras involucradas en la maquinaria de segregación de los cromosomas,²¹ su desregulación podría explicar los fenotipos nucleares observados. Por otra parte, el análisis de regresión lineal múltiple la frecuencia de células con micronúcleos sobre los polimorfismos *GSTO2* [rs2297235] y *MTHFR* [C677T], arrojó que dichos polimorfismos no tuvieron influencia significativa sobre esta variable ($p > 0,05$), aun cuando se observó una clara tendencia al incremento en la frecuencia de micronúcleos con la dosis para el alelo "G" del polimorfismo *GSTO2* [rs2297235] (Figura 2).

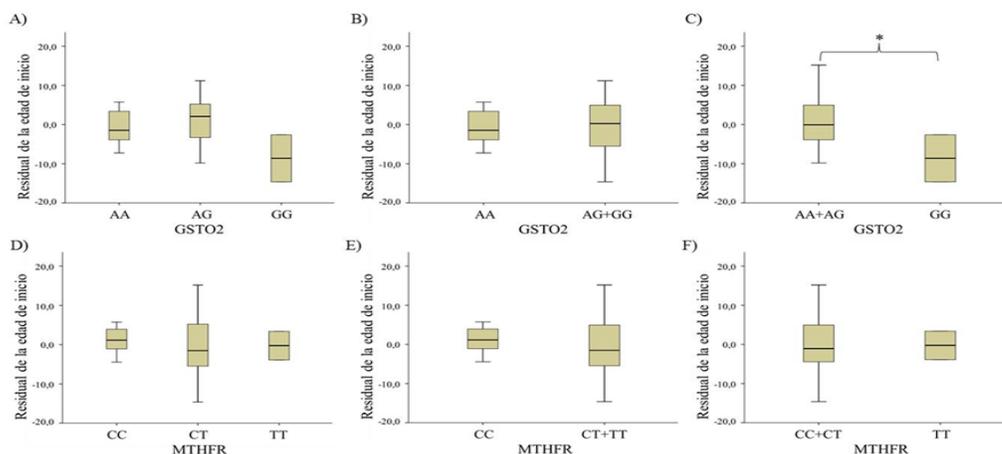


Figura 2. Comparación de la frecuencia de micronúcleos atendiendo a los genotipos *GSTO2* y *MTHFR*. A) Modelo aditivo para el locus *GSTO2*. B) Modelo dominante para el locus *GSTO2*. C) Modelo recesivo para el locus *GSTO2*. D) Modelo aditivo para el locus *MTHFR*. E) Modelo dominante para el locus *MTHFR*. F) Modelo recesivo para el locus *MTHFR*.

No obstante, se obtuvo que el polimorfismo *GSTO2* [rs2297235], y de acuerdo al modelo recesivo, tuvo una influencia significativa sobre la edad de inicio de la enfermedad. Este polimorfismo explicó el 8,1% de la variabilidad total de la edad de inicio, así como el 15,3% de la variabilidad no explicada por el número de repeticiones de CAG en el gen *ATXN2*. Según estos resultados, el ser portador del genotipo "GG" para el polimorfismo *GSTO2* [rs2297235] implicó, como promedio, el debut de la enfermedad ocho años antes en comparación con la edad de inicio en individuos portadores de los genotipos "AA" o "AG". Estos resultados obtenidos difieren de lo previamente publicado para la enfermedad de Huntington, donde se encontró que este polimorfismo no tuvo influencia significativa sobre la edad de inicio de la enfermedad.¹⁶ Esta observación podría apuntar a diferencias existentes en los mecanismos fisiopatológicos correspondientes a estas enfermedades.^{22,2}

Conclusiones

La presencia de atipias nucleares en células exfoliadas de la mucosa bucal está asociada a la SCA2, aunque no parece ser influido por la edad, sexo, número de repeticiones de CAG en alelos *ATXN2* o por los polimorfismos *GSTO2* [rs2297235] o *MTHFR* [C677T].

Bibliografía

1. Velázquez-Pérez L, Sánchez Cruz G, Santos Falcón N, Almaguer-Mederos LM, Escalona Batallan K, Rodríguez Labrada R, et al. Molecular epidemiology of spinocerebellar ataxias in Cuba: Insights into SCA2 founder effect in Holguin. *Neuroscience Letters* 2009; 454: 157–160.
2. Brusco A, Gellera C, Cagnoli C, Saluto A, Castucci A, Michielotto C, et al. Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: mutation analysis of spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 225 Italian families. *Arch Neurol.* 2004; 61(5):727-33.
3. Lorenzetti D, Bohlege S, Zoghbi HY. The expansion of the CAG repeat in ataxin-2 is a frequent cause of autosomal dominant spinocerebellar ataxia. *Neurology* 1997; 49: 1009- 1013.

4. Sinha KK, Worth PF, Jha DK, Sinha S, Stinton VJ, Davis MB, et al. Autosomal dominant cerebellar ataxia: SCA2 is the most frequent mutation in eastern India. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75:448–452.
5. Zhao Y, Tan EK, Law HY, Yoon CS, Wong MC. Prevalence and ethnic differences of autosomal-dominant cerebellar ataxia in Singapore. *Clin Genet* 2002; 62(6): 478-81.
6. 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.* 2017; 32(9):1329-1330.
7. Almaguer-Mederos LE, Falcon NS, Almira YR, Zaldivar YG, Almarales DC, Gongora EM, et al. Estimation of the age at onset in spinocerebellar ataxia type 2 Cuban patients by survival analysis. *Clin Genet* 2010; 78: 169–174.
8. Petrozzi L, Lucetti C, Scarpato R, Gambaccini G, Trippi F, Bernadini S, et al. Cytogenetic alterations in lymphocytes of Alzheimer's disease and Parkinson's patients. *Neurol. Sci.* 2002; 23(Suppl. 2), S97-S98.
9. Thomas P, Hecker J, Faunt J, Fenech M. Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease. *Mutagenesis* 2007; 22: 371-379.
10. Sathasivam K, Woodman B, Mahal A, Bertaux F, Wanker EE, Shima DT, Bates GP. Centrosome disorganisation in fibroblast cultures derived from R6/2. Huntington's disease (HD) transgenic mice and HD patients. *Hum. Mol. Genet.* 2010; 10:2425-2435.
11. Matilla-Deñás A, Sánchez L, Corral-Juan M, Dávalos A, Alvarez R, Latorre P. Cellular and molecular pathways triggering neurodegeneration in the Spinocerebellar Ataxias. *Cerebellum* 2010; 9(2):148-166.
12. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2009; 4 (6): 825–837.

13. Dhillon VS, Thomas P, Iarmarcovai G, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Fenech M. Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism influence micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 2011; 26(1): 33-42.
14. Ropper AH, Brown RH. Principles of neurology. 10th edition. McGraw-Hill, Inc., New York; 2010.
15. Brune N, Andrich J, Gencik M, Saft C, Müller T, Valentin S, Przuntek H, Epplen JT. Methyltetrahydrofolate reductase polymorphism influences onset of Huntington's disease. *J Neural Transm Suppl* 2004; 68:105-110.
16. Arning L, Jagiello P, Wieczorek S, Saft C, Andrich J, Epplen JT. Glutathione S-transferase Ω 1 variation does not influence age at onset of Huntington's disease. *BMC Medical Genetics* 2004; 5:7-11.
17. IBM Corporation 2011. SPSS (data analysis software system), version 20.
18. Wolf WA, Chew TL, Chisholm RL. Regulation of cytokinesis. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55:108-120.
19. Satterfield TF, Jackson SM, Pallanck LJ. A Drosophila homolog of the polyglutamine disease gene SCA2 is a dosage-sensitive regulator of actin filament formation. *Genetics* 2002; 162: 1687-1702.
20. Estrada R, Galarraga J, Orozco G, Nodarse A, Auburger G. Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2): morphometric analyses in 11 autopsies. *Acta Neuropathol* 1999; 97: 306-310.
21. Bloom K, Joglekar A. Towards building a chromosome segregation machine. *Nature* 2010; 28: 463(7280):446-456.
22. Orr HT. Polyglutamine neurodegeneration: expanded glutamines enhance native functions. *Curr Opin Genet Dev* 2012; 22(3): 251-255.
23. Orr HT. Cell biology of spinocerebellar ataxias. *J Cell Biol* 2012; 197(2); 167-177.