

Factores genéticos y fisiológicos modificadores del fenotipo clínico en la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

Entidad ejecutora principal: Centro para la Investigación y Rehabilitación de Ataxias Hereditarias (CIRAH) “Carlos J. Finlay”

Autor principal: DrC. Luis Enrique Almaguer Mederos

Otros autores:

Dr., MsC. Raúl Aguilera Rodríguez

Lic. Yanetza González Zaldívar

Lic. Nieves Santos Falcón

DrCs. Luis Velázquez Pérez

MsC. Yaimé Vázquez Mojena

DrC. José Miguel Laffita-Mesa

MsC. Dennis Almaguer Gotay

MsC. Danny Cuello Almarales

Colaboradores: 9.

Filiación de los autores:

Centro para la Investigación y Rehabilitación de Ataxias Hereditarias

Resumen

Antecedentes: La Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 es una enfermedad que representa un serio problema de salud para la provincia Holguín, dada su naturaleza neurodegenerativa, progresiva y hereditaria, por alcanzar las más elevadas tasas de incidencia y prevalencia del mundo en Holguín, y por no existir ninguna alternativa terapéutica efectiva para el tratamiento de los enfermos. **Problema científico:** Con este trabajo se dio solución a la carencia de una caracterización de la relación existente entre factores genéticos y fisiológicos, y el fenotipo clínico en familias cubanas con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. **Resultados:** Se logró la asimilación de tecnologías para la detección de mutaciones en seis genes asociados a la enfermedad de Huntington o a distintas formas de Ataxias Espinocerebelosas, lo que hizo posible la implementación de protocolos para el diagnóstico molecular, presintomático y prenatal de estas enfermedades en sujetos en riesgo. Se profundizó en la relación entre el genotipo y el fenotipo clínico en pacientes con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. Se demostró la asociación de los alelos *ATXN2* normales con la edad de inicio de la enfermedad, donde los alelos normales largos tienen un efecto protector expresado en una edad de inicio más tardía de la enfermedad. Se demostró la existencia de una dominancia incompleta del gen *ATXN2*, expresado en la manifestación de un fenotipo clínico más grave en los casos homocigóticos para la mutación causante de la enfermedad. Por primera vez en el mundo, se obtuvo un estimado de la heredabilidad de la varianza residual de la edad de inicio de la enfermedad, lo que contribuyó a fundamentar la concepción relativa a la existencia de factores genéticos y ambientales asociados a la variabilidad en el fenotipo clínico de la enfermedad. Por primera vez en nuestro país, se describieron las frecuencias alélicas para los genes *ATXN1*, *ATXN3*, *CACNA1A*, *TBP*, *HTT*, *DRPLA*, *MTDN3*, *GSTO1* y *GSTO2* en una muestra de la población cubana. Se demostraron por primera vez a nivel mundial, los efectos modificadores de los genes *CACNA1A*, *MTDN3* y *GSTO2* sobre marcadores clínicos de la enfermedad. También por primera vez a nivel mundial, se demostró la existencia de una asociación significativa entre la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 y los niveles séricos de anticuerpos antigliadina, sugiriendo la existencia de un componente auto-inmune asociado a los procesos fisiopatológicos de la enfermedad. Los hallazgos reportados son de gran importancia para la mejor comprensión de la historia natural, y de las bases genéticas y ambientales de la variabilidad clínica característica de la enfermedad. El empleo de muestras extensas, la integración de métodos genético-moleculares, clínicos y estadísticos, y un profundo análisis teórico de los resultados, proveen a la investigación de un elevado rigor científico. Los resultados obtenidos son de novedad mundial, y sirven de referencia para el abordaje de otras poblaciones del mundo afectadas por la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. Los resultados obtenidos tienen importantes aplicaciones clínicas, fundamentalmente al asesoramiento genético de individuos en riesgo en el contexto del Programa Nacional para el Diagnóstico Predictivo de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 y otras Ataxias Dominantes. También tienen aplicaciones a la identificación de dianas terapéuticas potenciales, y al diseño y evaluación de ensayos clínicos en busca de opciones terapéuticas para el tratamiento de los pacientes afectados. Los resultados fueron presentados en 33 eventos científicos provinciales (9), nacionales (4) e internacionales (20). Fueron merecedores de 13 premios y distinciones científico-técnicas provinciales (5), nacionales (6) e internacionales (2). Los resultados principales también fueron diseminados en forma de ocho publicaciones en revistas internacionales de corriente principal con elevado factor de impacto. Estos resultados también cuentan con

su registro en el Centro Nacional de Derecho de Autor (CENDA) con el número de registro 1701-06-2016.

Colaboradores:

DrC. Jacquelín Medrano Montero¹

DrC. Roberto Rodríguez Labrada¹

Lic. Annelié Estupiñán Rodríguez¹

DrC. Gilberto Sánchez Cruz¹

Lic. Nalia Canales Ochoa¹

Lic. Arnoy Peña Acosta¹

DrC. Jorge Aguiar Santiago²

Dr. Patrick MacLeod³

Dr. Georg Auburger⁴

Filiaciones de los colaboradores:

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

² Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.

³ Hospital General de Victoria, Columbia Británica, Canadá.

⁴ Sección de Neurogenética Molecular, Universidad de Frankfurt y Main, Frankfurt, Alemania.

Autor para la correspondencia:

DrC. Luis Enrique Almaguer Mederos

Dirección Postal: Calle 25, entre 4^{ta} y 8^{va}. Bloque 23. Apto. 6. Rpto. Lenin. Holguín. CP: 80100.

Teléfono (institucional): 24462823

Fax (Dirección Provincial de Salud): 24463579

E-Mail: lalmaguermederos@gmail.com

III. Comunicación corta que describe el resultado

1. Introducción

La Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 (SCA2) es una enfermedad neurodegenerativa y hereditaria, que alcanza la más elevada tasa de prevalencia a nivel mundial en la provincia Holguín: 40,18 cada 10^5 habitantes,¹ constituyendo un serio problema de salud para el territorio. Es causada por la expansión de una secuencia repetitiva de CAG ubicada en el primer exón del gen *ATXN2*.²

El fenotipo clínico de la SCA2 es muy variable y guarda un vínculo complejo con el genotipo, y se ha sugerido la existencia de factores genéticos adicionales al número de repeticiones de CAG en los alelos expandidos que, en interacción con factores fisiológicos y del ambiente externo, modifican el fenotipo clínico de la enfermedad.³⁻⁵

Entre los factores genéticos propuestos se encuentran el número de repeticiones de CAG en los alelos normales, la doble dosis genética, la existencia de patrones de metilación diferenciales y otros genes independientes al gen causante de la enfermedad, denominados genes modificadores.^{3, 6, 7} Por otra parte, en pacientes con ataxias hereditarias o con la enfermedad de Huntington, se ha comprobado la existencia de sensibilidad al gluten, expresada en el incremento anormal de los niveles de anticuerpos antigliadina.^{8, 9}

La identificación de factores genéticos o 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 y para la identificación de dianas farmacológicas y la proposición de estrategias terapéuticas. Por tanto, en esta investigación nos propusimos caracterizar la relación existente entre factores genéticos y fisiológicos, y el fenotipo clínico en familias cubanas con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. Los resultados obtenidos son de novedad a nivel mundial, y tienen aplicaciones al asesoramiento genético, a la identificación de dianas terapéuticas, y al diseño y evaluación de estrategias terapéuticas potenciales.

2. Influencia del número de repeticiones de CAG en alelos *ATXN2* normales y de la dosis genética sobre el fenotipo clínico de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

Se empleó una muestra de 745 pacientes con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 con evaluación neurológica y genealógica completas y con diagnóstico molecular de SCA2. Se obtuvo que los alelos *ATXN2* expandidos contribuyeron a explicar el 74,3% de la variabilidad observada en la edad de inicio de la enfermedad, mientras que los alelos *ATXN2* normales contribuyeron en un discreto 0,5% adicional a la varianza total de la edad de inicio, y en un 1,95% a la varianza de la edad de inicio no explicada por los alelos *ATXN2* expandidos. Los alelos normales largos se asociaron significativamente a edades de inicio más tardías. Nunca antes, a nivel mundial, se había podido demostrar la existencia de un efecto modificador de los alelos *ATXN2* normales sobre el fenotipo clínico de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. Entre los factores que potencialmente pudieran estar influyendo en estos resultados, se relacionan el uso de muestras muy pequeñas o heterogéneas desde el punto de vista étnico y la escasa variabilidad de estos alelos en las muestras estudiadas.¹⁰

Para la evaluación del efecto de la dosis genética sobre el fenotipo clínico en la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 se seleccionó una muestra integrada por los cinco enfermos

homocigóticos para alelos *ATXN2* expandidos identificados en la población cubana con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. Se obtuvo que los individuos homocigóticos genotipos de 35/35 o 33/41 repeticiones de CAG, enfermaron a edades más tempranas que lo esperado en comparación con individuos heterocigóticos. Efectos similares de la dosis genética sobre el fenotipo clínico en la SCA2 se han reportado en pacientes de la India e Italia,^{11, 12} con distinto trasfondo genético que los casos cubanos, lo que enfatiza el rol principal de los alelos expandidos en la determinación del fenotipo clínico.

3. Componentes genético y ambiental de la varianza residual de la edad de inicio

En los 359 pares de hermanos estudiados, se obtuvo una familiaridad del 47,9% para la varianza residual de la edad de inicio, significando que ~48% de la varianza residual en la edad de inicio es atribuible a factores genéticos independientes del número de repeticiones de CAG en alelos *ATXN2* normales y expandidos, y a factores ambientales compartidos por los familiares estudiados.

Los resultados obtenidos fueron re-evaluados por medio de un análisis de componentes poligénicos de varianza con el uso del software SOLAR, tomando en consideración la estructura genealógica de las familias involucradas en el estudio. Se obtuvo una familiaridad de la varianza residual de la edad de inicio del 33,0% ($p=0,008$), que fue mayor cuando fue estimada solamente entre hermanos (58%; $p=0,001$), que entre pares progenitor-descendiente (10%; $p=0,02$). Adicionalmente, se obtuvo que la familiaridad de la varianza residual de la edad de inicio fue más que el doble entre pares de hermanos de sexo femenino que entre pares de hermanos de sexo masculino, aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística ($p>0,05$). Los pares de hermanos de sexo masculino mostraron más bajas correlaciones para la edad de inicio no ajustada ($p=0,05$) o ajustada ($p=0,001$). Estos estimados concuerdan con los previamente reportados para la enfermedad de Huntington (38-56%).¹³

La baja correlación obtenida entre pares de hermanos pudiera deberse a factores hormonales, o a estilos de vida específicos o más frecuentes entre individuos de sexo masculino. Por otra parte, es conocido que los individuos de sexo masculino comparten el mismo cromosoma X en el 50% de las ocasiones, mientras que los individuos de sexo femenino siempre reciben el mismo cromosoma X del padre, y el mismo cromosoma X de la madre en el 50% de las ocasiones, lo que sugiere la posible existencia de factores modificadores ligados al cromosoma X. Los resultados obtenidos fundamentan la existencia de factores genéticos *trans*-actuantes y de factores ambientales no compartidos por los familiares, con influencia significativa sobre la edad de inicio de la enfermedad.¹³

4. Genes modificadores del fenotipo clínico en pacientes cubanos con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

Con el uso de diferentes estrategias de muestreo se evaluó el efecto polimorfismos en los genes *ATXN1*, *ATXN3*, *CACNA1A*, *TBP*, *HTT*, *DRPLA*, *AR*, *MTDN3*, *GSTO1* y *GSTO2*, sobre marcadores del fenotipo clínico de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. Se obtuvo que la variación del número de repeticiones de CAG en el gen *CACNA1A*, contribuyera a explicar el 6% de la varianza residual de la edad de inicio de la enfermedad. Se propone que el gen *CACNA1A* podría influir sobre la edad de inicio a través de su interacción directa con la ataxina-2 o a través de la alteración de su función como canal de calcio dependiente de voltaje.¹⁴ De modo similar, en 46 pacientes con edades de inicio discordantes se comprobó que el polimorfismo 10398G del gen *MTDN3*

se asocia a una edad de inicio más temprana, lo que sugiere la ocurrencia de disfunción mitocondrial como parte de la fisiopatología de la enfermedad. Se ha comprobado que la disfunción de las mitocondrias es importante en la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas.¹⁵

A partir de la evaluación de los polimorfismos de un solo nucleótido rs4925 y rs2297235 en los genes *GSTO1* y *GSTO2*, respectivamente, en una muestra de 120 pacientes con SCA2 y 100 sujetos controles, se obtuvieron las frecuencias alélicas y genotípicas correspondientes. Existen evidencias de que polimorfismos en los genes *GSTO1* y *GSTO2* codificantes de glutatión-S-transferasas de la clase omega, modifican significativamente la edad de inicio de las enfermedades de Alzheimer y Parkinson.¹⁶ Basados en modelos de regresión, se obtuvo que los genotipos para el polimorfismo *GSTO2* rs2297235 explican el 2,5% de la varianza total y el 3,9% de la varianza de la edad de inicio no explicada por el número de repeticiones de CAG en alelos *ATXN2* expandidos. Se ha comprobado que las representantes de la clase omega de las GST brindan protección contra los efectos nocivos de xenobióticos y especies reactivas del oxígeno, y que podrían modular la liberación de iones de calcio intracelular a través de los receptores de rianodina.¹⁷ Significativamente, la SCA2 se ha asociado a un incremento en la actividad relativa de GST, estrés oxidativo, y alteraciones en rutas de señalización mediadas por receptores de rianodina.¹⁸ Sobre la base de las evidencias anteriores, parece una hipótesis muy atractiva el que polimorfismos *GSTO* incrementen la susceptibilidad al estrés oxidativo y a alteraciones en el funcionamiento de los receptores de rianodina, provocando así un incremento en la gravedad clínica de los pacientes con SCA2.

5. Asociación de los niveles séricos de anticuerpos antigliadina con la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2

En una muestra de 64 pacientes con SCA2 y 65 controles sanos, se obtuvieron niveles elevados de anticuerpos antigliadina en el 23,4% de los pacientes y el 9,09% de los controles. Se obtuvieron diferencias significativas entre los dos grupos ($\chi^2=3,94$; $p=0,047$). Se obtuvieron resultados similares para niveles muy elevados de anticuerpos antigliadina ($\chi^2=4,62$; $p=0,032$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los pacientes positivos y negativos para los anticuerpos antigliadina en cuanto a las variables clínicas consideradas en el estudio, o en cuanto al número de repeticiones de CAG. Resultados similares se han obtenido en pacientes con ataxias hereditarias o con la enfermedad de Huntington,^{8,9} y sugieren la existencia de un componente auto-inmune en la fisiopatología de estas enfermedades, si bien la significación clínica de este fenómeno parece ser muy limitada.

Conclusión

La investigación aquí presentada representa la más completa caracterización de la relación existente entre factores genéticos y fisiológicos, y el fenotipo clínico en la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 a nivel mundial. Los resultados obtenidos han permitido demostrar la existencia de factores genéticos y ambientales asociados a la determinación del fenotipo clínico, profundizar en los mecanismos fisiopatológicos potencialmente implicados en la enfermedad, e identificar dianas y estrategias terapéuticas potenciales. Además, se propició la implementación de protocolos para el diagnóstico molecular y predictivo de varias Ataxias Espinocerebelosas, de la Atrofia Muscular Espinobulbar, de la Atrofia Dentatorubral-Páldoluisiana y de la enfermedad de Huntington.

Referencias bibliográficas

1. Velázquez-Pérez L, Sánchez-Cruz G, Santos-Falcón N, Almaguer-Mederos LE, 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. Klockgether T, Paulson H. Milestones in Ataxia. *Movement Disorders* 2011; 26(6): 1134-1141.
3. 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.
4. du Montcel ST, Durr A, Bauer P, Figueroa KP, Ichikawa Y, Brussino A, et al. Modulation of the age at onset in spinocerebellar ataxia by CAG tracts in various genes. *Brain* 2014; 137: 2444-55.
5. Bettencourt C, Raposo M, Kazachkova N, Cymbron T, Santos C, Kay T, et al. The APOE ϵ 2 Allele Increases the Risk of Earlier Age at Onset in Machado-Joseph Disease. *Arch Neurol*. 2011; 68(12):1580-1583.
6. Bauer PO, Zumrova A, Matoska V, Mitsui K, Goetza P. Can ataxin-2 be down-regulated by allele-specific de novo DNA methylation in SCA2 patients? *Medical Hypotheses* 2004; 63: 1018-1023.
7. Pulst SM, Santos N, Wang D, Yang H, Huynh D, Velázquez L, Figueroa KP. Spinocerebellar ataxia type 2: polyQ repeat variation in the CACNA1A calcium channel modifies age of onset. *Brain* 2005; 128:2297-2303.
8. Abele M, Schols L, Schwartz S, et al. Prevalence of antigliadin antibodies in ataxia patients. *Neurology* 2003; 60:1674-5.
9. Bushara KO, Nance M, Gomez CM. Antigliadin antibodies in Huntington's disease. *Neurology* 2004; 62:132-3.
10. van de Warrenburg BP, Hendriks H, Durr A, van Zuijlen MC, Stevanin G, Camuzat A, et al. Age at onset variance analysis in spinocerebellar ataxias: a cohort study in a Dutch-French cohort. *Ann Neurol* 2005; 57:505-512.
11. Spadafora P, Annesi G, Liguori M, Tarantino P, Cutuli N, Carrideo S, et al. Gene dosage influences the age at onset of SCA2 in a family from southern Italy. *Clin Genet* 2007; 72: 381-383.
12. Ragothaman M, Muthane U. Homozygous SCA2 mutations changes phenotype and hastens progression. *Movement Disorders* 2008; 23(5): 770-701.
13. Wexler NS, Lorimer J, Porter J, Gomez F, Moskowitz C, Shackell E, et al. Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2004; 101(10):3498-503.
14. Jun K, Piedras-Renteria ES, Smith SM, Wheeler DB, Lee SB, Lee TG, et al. Ablation of P/Q-type Ca^{2+} channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the $\alpha 1A$ - subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 15245-50.
15. Guedes-Dias P, Pinho BR, Soares TR, de Proença J, Duchén MR, Oliveira JMA. Mitochondrial dynamics and quality control in Huntington's disease. *Neurobiology of Disease* 2016; 90: 51-57.
16. Allen M, Zou F, Chai HS, Younkin CS, Miles R, Nair AA, et al. Glutathione S-transferase omega genes in Alzheimer and Parkinson disease risk, age-at-diagnosis and brain gene expression: an association study with mechanistic implications. *Molecular Neurodegeneration* 2012; 7:13.
17. Board PG. The omega-class glutathione transferases: structure, function, and genetics. *Drug Metab Rev.* 2011; 43(2):226-35.
18. Egorova P, Popugaeva E, Bezprozvanny I. Disturbed calcium signaling in spinocerebellar ataxias and Alzheimer's disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2015; 40:127-33.