



Equilibrio redox en la ataxia espinocerebelosa tipo 2. Caracterización e implicaciones terapéuticas

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Centro para la Investigación y Rehabilitación de Ataxias Hereditarias (CIRAH). Holguín, Cuba

AUTORES: Dennis Almaguer Gotay, Luis E. Almaguer Mederos, Raúl Aguilera Rodríguez, Luis C. Velázquez Pérez, Julio C. Díaz Rodríguez, Yanetza González Zaldívar, Yaimeé Vázquez Mojena, Dany Cuello Almarales, Roberto Rodríguez Labrada

Filiación: Centro para la Investigación y Rehabilitación de Ataxias Hereditarias (CIRAH). Holguín, Cuba

RESUMEN

La ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2) es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por la presencia de signos clínicos como ataxia de la marcha y enlentecimiento de los movimientos oculares sacádicos. La SCA2 presenta la mayor prevalencia mundial en la provincia de Holguín, donde existen aproximadamente 700 personas afectadas para las cuales no hay tratamiento farmacológico curativo. Varias investigaciones han sugerido la existencia de alteraciones redox en la SCA2, pero no se ha esclarecido cuál es su vínculo con el mecanismo fisiopatológico de la enfermedad y tampoco se han identificado biomarcadores redox fiables que permitan una adecuada evaluación de los efectos terapéuticos de las diferentes estrategias de intervención antioxidantes propuestas. Se caracterizó el estado de diferentes mecanismos antioxidantes en una amplia muestra de pacientes SCA2 y sujetos en estadio presintomático, y se analizó la interrelación entre las alteraciones redox identificadas y el fenotipo clínico de la enfermedad. Se implementaron y estandarizaron técnicas de biología molecular para el análisis de polimorfismos de simple nucleótido en los genes antioxidantes *GSTO1* y *GSTO2*, y se evaluó la repercusión clínica de estas modificaciones genéticas. Se corroboró la existencia de alteraciones significativas en los mecanismos de defensas antioxidantes de los pacientes con SCA2, y se evidenció que las alteraciones del equilibrio redox están interrelacionadas con el proceso neurodegenerativo de la SCA2. Fue identificado el polimorfismo de simple nucleótido *GSTO2* rs2297235 como un biomarcador de gravedad clínica de la enfermedad. El empleo de muestras extensas, la integración de métodos genéticos, bioquímicos, clínicos, estadísticos, y un profundo análisis teórico de los resultados, proveen a la investigación de un elevado rigor científico. Los resultados obtenidos tienen novedad y sirven de referencia para el abordaje de otras poblaciones del mundo afectadas por la ataxia espinocerebelosa tipo 2. Además, han tenido importantes aplicaciones clínicas, fundamentalmente en el diseño y evaluación de ensayos clínicos, así como en la identificación de genes modificadores del fenotipo clínico de la enfermedad que representan dianas terapéuticas potenciales. Los resultados fueron presentados en 18 eventos científicos: internacionales (10), nacionales o provinciales (8). Fueron merecedores de 8 premios y distinciones científico-técnicas: internacionales (1), nacionales (3) y provinciales (4). Los resultados principales también fueron diseminados en forma de 7 publicaciones científicas, 6 de las cuales son internacionales.

Palabras clave

equilibrio redox; ataxia espinocerebelosa tipo 2; implicaciones terapéuticas

La ataxia espinocerebelosa tipo 2 es una enfermedad neurodegenerativa, que es causada por la expansión de la secuencia repetitiva de CAG en el locus *ATXN2* y la síntesis de variantes mutadas de la ataxina-2.¹ Varias investigaciones han sugerido que el desequilibrio redox celular constituye uno de los mecanismos a través de los cuales la ataxina-2 y otras proteínas patológicas inducen el proceso neurodegenerativo en las enfermedades poliglutámicas.^{2,3} Sin embargo, no se ha esclarecido el rol de las alteraciones redox en la fisiopatología de la ataxia espinocerebelosa tipo 2, y tampoco se han identificado biomarcadores redox fiables que permitan una adecuada evaluación de los efectos terapéuticos de las diferentes estrategias de intervención propuestas, lo que en la práctica ha limitado su alcance clínico.

En este contexto, se realizó una investigación en la que mediante el análisis de parámetros bioquímicos y genéticos, y estudiando la asociación de estos con diferentes marcadores del fenotipo clínico, se identificaron biomarcadores redox que reflejan el deterioro neurológico de los pacientes SCA2 y que, por consiguiente, son útiles en el diseño y evaluación de diferentes estrategias terapéuticas.

Análisis de la capacidad antioxidante total como biomarcador del fenotipo clínico de la SCA2

Se estudiaron 38 pacientes pertenecientes a 24 familias cubanas con SCA2 y controles pareados por sexo y edad para caracterizar el estado antioxidante en los sujetos afectados, y evaluar la asociación entre la capacidad antioxidante total (TAC, por sus siglas en inglés) y varios parámetros clínicos-moleculares característicos de la SCA2. Los pacientes y los controles difirieron significativamente con relación a la TAC, siendo inferior en un 27,9 % en el grupo de los sujetos afectados. La pérdida de la TAC se asoció con el incremento del número de repeticiones de CAG, aunque la significación estadística alcanzada fue solo marginal ($r = -0,33$; $p = 0,06$). Sin embargo, la correlación entre la TAC y la edad de inicio no fue significativa estadísticamente.

Se demostró que la mutación causante de la SCA2 se asocia con alteraciones del equilibrio redox, que consisten en la pérdida de las actividades antioxidantes no enzimáticas. Adicionalmente, se comprobó que a través del análisis del suero sanguíneo es posible caracterizar objetivamente el estado redox en las personas afectadas. El estudio constituyó el punto de partida de las investigaciones sobre el equilibrio redox en el Centro para la Investigación y Rehabilitación de Ataxias Hereditarias (CIRAH), y sugirió la potencial implicación de las alteraciones de los mecanismos de defensa antioxidantes en los mecanismos fisiopatológicos de la SCA2.

Análisis de la actividad enzimática de las glutatión-S-transferasas como biomarcador del fenotipo clínico de la SCA2

Se analizó el suero sanguíneo de 121 pacientes con SCA2, 38 sujetos en estadio presintomáticos y 38 controles pareados por sexo y edad, para evaluar la actividad de las glutatión-S-transferasas (GST) y su utilidad como biomarcador del fenotipo clínico de la SCA2, considerando que estas enzimas desempeñan un importante papel en el control del equilibrio redox, el metabolismo de xenobióticos y en la regulación de la apoptosis celular.⁴

Los pacientes presentaron un incremento significativo de la actividad de las GST; en cambio, los sujetos presintomáticos presentaron una actividad de las GST en un rango intermedio entre los valores correspondientes a los pacientes y los controles. Adicionalmente, el incremento de la actividad de las enzimas GST se asoció con la intensificación de la gravedad clínica de la enfermedad, que fue analizada mediante la escala clínica para la evaluación y clasificación de la ataxia (SARA). Los cambios en la actividad enzimática explicaron aproximadamente el 8 % de la variabilidad de la gravedad clínica.

En conjunto, estos resultados sugieren que la actividad enzimática de las glutatión-S-transferasas presentes en mayor proporción en el suero sanguíneo (GST α y GST π), constituye un biomarcador útil para evaluar los cambios fenotípicos y redox asociados con el proceso fisiopatológico de la ataxia espinocerebelosa tipo 2. Además, se evidenció la necesidad de estudiar otras enzimas que participan en los mecanismos primarios de la defensa antioxidante, en particular de la familia de las GST, como potenciales modificadores del fenotipo clínico.

Polimorfismos de simple nucleótido como herramientas para la identificación de potenciales dianas terapéuticas en la SCA2: análisis de los genes *GSTO1* y *GSTO2* como modificadores del fenotipo clínico

Se analizaron los polimorfismos rs4925 y rs2297235 en los genes que codifican para las enzimas GSTO1 y GSTO2, respectivamente, con el objetivo de evaluar su contribución al proceso neurodegenerativo de la SCA2. Fueron seleccionados 120 pacientes y 100 controles de ambos sexos, de la misma zona geográfica y con antecedentes étnicos similares.

Se observó una asociación significativa entre los alelos SCA2 y GSTO2 rs2297235. Los pacientes tuvieron una probabilidad 2,29 veces superior de portar un alelo G en GSTO2 rs2297235, aunque esta asociación dejó de ser significativa después de aplicar la prueba estadística de corrección de Bonferroni. Asumiendo el genotipo salvaje "AA" como la referencia, los pacientes tuvieron una mayor frecuencia del geno-

tipo "AG" en comparación a los controles (43,3 % vs. 22,0 %, respectivamente; $p = 0,0014$).

Mediante un análisis de regresión lineal, se demostró que en los sujetos afectados la secuencia repetitiva de CAG en los alelos *ATXN2* expandidos explican el 36 % de la variabilidad de la edad de inicio ($R^2 = 0,359$; $p < 0,001$). La incorporación de los genotipos *GSTO2* en el modelo de regresión diseñado para estimar la edad de inicio, mejoró el coeficiente de determinación en un 6,5% ($R^2 = 0,384$; $p = 0,037$) (figura 1).

Los genotipos *GSTO2* rs2297235 explicaron un 2,5 % de la varianza total de la edad de inicio y un 3,9 % de la varianza residual de la edad de inicio no definida por la secuencia expandida de CAG. En un análisis adicional, se demostró que, mientras la media de la edad de inicio para los pacientes *GSTO2* "AA" fue de 33,7 años, los sujetos portadores de los genotipos "AG" y "GG" enfermaron como promedio a los 28,3 ($p = 0,022$), lo cual significa que la presencia de al menos un alelo G reduce el momento del inicio clínico en aproximadamente 5,4 años.

Este estudio permitió concluir que el genotipo *GSTO2* rs2297235 "AG" está asociado con la SCA2, y señaló la utilidad del análisis del polimorfismo rs2297235 como una herramienta útil en la evaluación de futuras estrategias terapéuticas y en el perfeccionamiento del asesoramiento genético.

Análisis de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa como biomarcadores del fenotipo clínico de los pacientes con SCA2

Las actividades de las enzimas superóxido dismutasas (SOD) y catalasa (CAT) son componentes esenciales de la

maquinaria antioxidante celular que se encarga de controlar la producción de especies reactivas. Ambas enzimas actúan de forma sinérgica catalizando dos reacciones consecutivas. Las SOD catalizan la dismutación del radical superóxido ($\cdot O_2^-$) a peróxido de hidrógeno, que es a su vez transformado en agua por acción de la CAT, evitando el daño que estas especies reactivas pueden generar sobre las biomoléculas.⁵

En esta investigación, a partir del estudio de 64 pacientes y controles pareados por sexo y edad, se evaluó el estado catalítico de las enzimas SOD3 y CAT. Se demostró que los pacientes presentan una significativa reducción de la actividad de la SOD3; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en relación con la actividad de la CAT. El análisis efectuado en una muestra incrementada de 97 pacientes demostró que en las personas afectadas por la SCA2 la actividad de las enzimas SOD3 y CAT no estaba significativamente asociada con ninguno de los marcadores clínicos estudiados.

En conjunto, los resultados sugieren que la pérdida de la actividad de la SOD3 a nivel sistémico podría ser un epifenómeno, significando que no está directamente vinculada con el mecanismo fisiopatológico primario asociado al proceso neurodegenerativo de la SCA2.

Consideraciones finales

La investigación corroboró que en los pacientes SCA2 ocurren alteraciones significativas de los mecanismos antioxidantes primarios, que los hacen más susceptibles a los efectos citotóxicos de las especies reactivas. En consonancia con lo anterior, también se comprobó que polimorfismos genéticos presentes en genes que codifican enzimas con

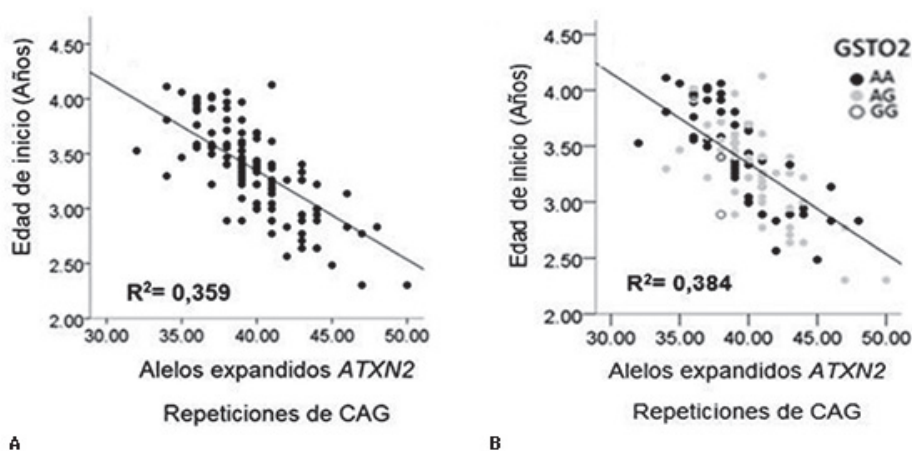


Fig. 1. Análisis de regresión lineal simple y múltiple para la edad de inicio en pacientes con SCA2 ($n = 120$). A) Regresión de la edad de inicio sobre los alelos *ATXN2* expandidos. B) Regresión de la edad de inicio sobre los alelos *ATXN2* expandidos y el polimorfismo *GSTO2* rs2297235.

función antioxidante potencian este efecto. Además, se identificaron biomarcadores redox asociados al curso clínico de la enfermedad que, por consiguiente, son útiles como potenciales dianas moleculares para tratamientos farmacológicos o para evaluar diferentes estrategias terapéuticas.

Los resultados de la investigación han sido divulgados en 7 publicaciones científicas, presentan 51 citas y un premio internacional, además de varios premios nacionales y provinciales. Los resultados obtenidos han sido introducidos en la evaluación de la utilidad clínica de candidatos terapéuticos en el contexto de dos ensayos clínicos y una intervención terapéutica.

Referencias bibliográficas

1. Velázquez-Pérez LC, Rodríguez-Labrada R, Fernández-Ruiz J. Spinocerebellar Ataxia Type 2: Clinicogenetic Aspects, Mechanistic Insights, and Management Approaches. *Front. Neurol* 2017; 8: 472.
2. Ajayi A, Yu X, Lindberg S, Langel Ü, Strö A. Expanded ataxin-7 cause toxicity by inducing ROS production from NADPH oxida-

se complexes in a stable inducible Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) model. *MC Neuroscience* 2012; 13: 86.

3. Liu Z, Zhou T, Ziegler CA, Dimitrion P, Zuo L. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 2525967.
4. Kano S, Choi EY, Dohi E, Rose VLI, Chang JD, Wilson MA, et al. Glutathione S-transferases: unexpected roles in astrocyte activation and astrocyte-microglia communication during brain inflammation. *bioRxiv* 2017. DOI:10.1101/199612.
5. Balasaheb NS, Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv* 2015; 5:27986-28006.

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA

Dennis Almaguer Gotay. *Calle Libertad No 26, % 12 y 14, El Llano Holguín, CP 80100. Correo electrónico: dennisalmaguer@gmail.com; dennisag@infomed.sld.cu*