

RESEÑA

MARCAJE DE NUCLEÓTIDOS PIRIMIDÍNICOS DEL ADN Y SU CUANTIFICACIÓN PARA SER EMPLEADOS EN EL DIAGNÓSTICO DE REPETIDOS CAG

Lic. Dannelys Pérez-Bello

Licenciada en Bioquímica, Máster en Neurobiología Molecular y Celular e Investigadora Agregada.
Departamento de Biología Molecular, Centro de Neurociencias de Cuba, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

8 de septiembre de 2010.

TRABAJO PRESENTADO EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE DOCTORA EN CIENCIAS DE LA SALUD.

En los últimos años, la dilucidación de las bases moleculares de un gran número de enfermedades de origen genético ha sido posible gracias al desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico que emplean sondas de ADN marcadas. Estas técnicas se pueden ejecutar mediante procedimientos *in vivo* o *in vitro*. En el primer caso, se incluyen los métodos por inhibición de rutas metabólicas, el empleo de cepas auxótrofas para un nucleósido y el marcaje metabólico en cepas salvajes. Por otro lado, entre los procedimientos *in vitro* se encuentran cebador al azar y traducción de un solo corte (*random primer and nick translation*) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*), así como un método no enzimático que se lleva a cabo a través de reacciones de transaminación-acilación sobre la molécula de citidina del ADN. Los tres primeros métodos de marcaje *in vitro* son los más utilizados en la práctica médica para el diagnóstico molecular de enfermedades.

En los últimos 20 años, se ha evidenciado un avance en el diagnóstico de las enfermedades neurodegenerativas y entre ellas, las causadas por mutaciones dinámicas. En específico, las expansiones de trinucleótidos repetidos (TNRs) CAG han sido estudiadas y en la actualidad se han descrito varias enfermedades que contienen alteraciones en este motivo: ataxia espino-cerebelar tipo 2 y tipo 3 (SCA2 y SCA3, del Inglés *spinal cerebellar ataxia type II and III*), dentado-rubro-pálido-luisiana (DRPLA), enfermedad de Huntington (HD, del inglés *Huntington disease*), y atrofia muscular espino-bulbar (SBMA, del inglés *spinal and bulbar muscular atrophy*).

En el caso de las ataxias hereditarias, la evidencia disponible apunta a que los desórdenes provocados por la enfermedad se deben a una nueva función nociva de las secuencias de poliglutaminas extendidas dentro de las proteínas codificadas por los genes respectivos. Cada año, uno o dos nuevos genes son adicionados a la lista de los que ocasionan las ataxias autosómicas dominantes, y con ello aumenta el número de variantes de la enfermedad diagnosticada molecularmente. Es ahora conocido que más de 100 genes tienen repetidos CAG, y se ha progresado rápidamente hacia la dilucidación de los mecanismos celulares y moleculares por los cuales las mutaciones causan degeneración neuronal.

La prevalencia de casos familiares es aproximadamente de 1/100 000 en el mundo y 5/100 000 en Europa. En Cuba en la provincia de Holguín se encuentra alrededor de 40/100 000, donde resalta el municipio de Báguanos con 141,66 casos de ataxia espino-cerebelar tipo 2.

Las enfermedades neurodegenerativas, caracterizadas por expansiones de TNRs, no pueden ser diferenciadas clínicamente debido a su variable expresión génica y coincidencia fenotípica dentro de los diferentes subtipos que las caracterizan. Por ello, su diagnóstico inequívoco se obtiene a través del análisis genético molecular.

Actualmente, los métodos de diagnóstico más empleados para estas enfermedades son procedimientos *in vitro*, con una combinación de la PCR y análisis de los fragmentos de los productos obtenidos y como técnica confirmatoria Southern blot o secuenciación, según sea la talla de las extensiones de TNR que se analicen. En Cuba, el diagnóstico se realiza con el empleo de marcadores fluorescentes para la PCR, los cuales han sido ampliamente empleados con esta finalidad por muchos otros investigadores. Esto ha demostrado la efectividad de las marcas no radioactivas en este campo, las cuales han sustituido por completo a los radiomarcadores. Así, las marcas inmunoquímicas han ido ocupando el lugar de los fluoróforos, debido a que no requieren equipos costosos para su determinación. Un pesquiasaje masivo de individuos sospechosos de padecer estas enfermedades se facilitaría por esta vía. Es por ello, que muchos sistemas para el marcaje y detección de ADN con múltiples aplicaciones biomédicas, han sido diseñados sobre esta base.

En el Departamento de Biología Molecular del Centro de Neurociencias de Cuba, se ha trabajado en el desarrollo de un sistema de marcaje inmunoquímico del ADN empleando el radical *p*-bromobenzoílo, el cual ha sido introducido en la posición 4 ó 5 de la molécula de timidina, a través de síntesis química, lo que ha permitido obtener análogos de timidina y citidina. Asimismo, se ha obtenido el anticuerpo monoclonal (AcM 5H11E5) que reconoce la marca con elevada especificidad.

En este estudio, se planteó desarrollar un método económico, rápido y sencillo de marcaje de moléculas de ADN, tanto *in vivo* como *in vitro* con el empleo de una marca inmunoquímica, que pudiera ser identificada y cuantificada para estimar el número de moléculas que portan la marca presente en secuencias de ADN y su posterior empleo en el diagnóstico de enfermedades ocasionadas por repetidos CAG. Para ello, se evaluó en primer lugar, la eficiencia de diferentes procedimientos de marcaje *in vivo* en ADN plasmídico, en células de bacterias *Escherichia coli* DH5 α , con el empleo de la 5-bromodesoxiuridina (5-BrdUrd, como marca de referencia); con el objetivo de emplear posteriormente el procedimiento más eficiente para la introducción de las marcas inmunoquímicas sintetizadas en el Centro de Neurociencias de Cuba.

En uno de los procedimientos se evaluó el efecto inhibitorio de la 5-fluordesoxiuridina (5-FdUrd), sobre la timidilato sintasa (TSasa) de una cepa *E. coli*, como una vía para la introducción de la 5-BrdUrd, como análogo estructural de la timidina, en el

ADN plasmídico de la bacteria. Se determinó que cuando el inhibidor y la 5-BrdUrd se adicionan al inicio de la fase exponencial de crecimiento, se produce de forma inmediata la inhibición de la *TSasa* y a su vez, la incorporación de la 5-BrdUrd en el ADN. Así, la 5-BrdUrd induce un proceso similar a cuando se incorpora la timidina en condiciones normales, sin haber inhibición, ya que se induce la reactivación de la síntesis de ADN.

Un segundo método para la introducción de un análogo de timidina y obtención de ADN plasmídico marcado, a través de la suplementación exógena de la 5-BrdUrd, fue la obtención de una cepa auxótrofa para la timidina, con el empleo del agente mutagénico *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (50 µg/mL).

A través de estos dos métodos y asumiendo una isodistribución de nucleótidos, se obtuvo un 24 % de sustitución de timidina por la 5-BrdUrd, con respecto al ADN total sintetizado.

Otro método de marcaje utilizado fue el metabólico para la introducción de la 5-BrdUrd (200 µg/mL) en secuencias de ADN plasmídico, en células de bacterias *E. coli* de una cepa DH5α transformada con el plasmidio Yep13. La sensibilidad en este caso fue seis veces menor que con los métodos anteriores. Este resultado evidencia que las diferencias estructurales entre la timidina y la 5-BrdUrd son detectadas por las kinasas, ya que se fosforila preferencialmente la timidina. A partir de este fenómeno es que la célula no detiene la biosíntesis del dTTP y por ello, el porcentaje de incorporación de la 5-BrdUrd es menor. Por lo tanto, los procedimientos de inhibición de la *TSasa* por acción de la 5-FdUrd y de una cepa auxótrofa para la timidina fueron los más eficientes para la introducción de la 5-BrdUrd en el ADN plasmídico. Sin embargo, el radical *p*-bromobenzoílo presente en los análogos de timidina no se detectó en el ADN plasmídico marcado.

A partir de estos resultados, se implementó un procedimiento de marcaje *in vitro* no enzimático de moléculas de citidinas en el ADN de timo de ternera, a través de reacciones de transaminación-acilación con el empleo de diferentes ésteres de *N*-hidroxisuccinimida de los ácidos *p*-bromobenzoico (BLC4-NHS), 3-*p*-(bromobenzoilamido)propiónico (BLC8-NHS) y 6-*p*-(bromobenzoilamido)caproico (BLC11-NHS) y se evaluó la introducción del radical *p*-bromobenzoílo presente en las moléculas de ADN con el empleo de un anticuerpo monoclonal murino y un policlonal de pollo, en ensayos de *Dot Blot*. Se determinó que tanto los anticuerpos policlonales de pollo (presentes en los sueros), como el anticuerpo monoclonal de ratón anti-BLC11, reconocen al radical *p*-bromobenzoílo en los tres ADN marcados, con diferente sensibilidad en dependencia de las longitudes de los brazos espaciadores, (BLC4-ADN, BLC8-ADN y BLC11-ADN); siendo la detección de la marca tres veces más sensible cuando se emplea el brazo espaciador de 11 átomos (BLC11-ADN).

Con el objetivo de obtener una nueva metodología de estimación de repetidos CAG en secuencias de ADN y evaluar la aplicabilidad del método desarrollado en este trabajo, se llevó a cabo la obtención, marcaje no enzimático y cuantificación de secuencias modelos formadas con estos motivos. El método diseñado se desarrolló sobre la base de secuencias modelos de TNRs del gen *ATXN2* de SCA2; y de muestras de ADN extraídas de sangre de pacientes que padecían de SCA3, clínicamente diagnosticados, cuya región de TNRs, correspondiente al gen *ATXN3* de SCA3, fue amplificada y purificada. Cada secuencia de ADN se marcó con diferentes ésteres de *N*-hidroxisuccinimida del ácido *p*-bromobenzoico, a través de reacciones de transaminación-acilación. Los ensayos de detección y cuantificación de los repetidos CAG en los ADN marcados se llevaron a cabo sobre plataforma de *Dot Blot* quimioluminiscente y ELISA. Así, es posible diferenciar el número de repetidos CAG entre valores normales y patológicos, para SCA2 y SCA3. Se comprobó que existe una correlación lineal entre el número de repetidos CAG marcados con BLC11, en las secuencias modelos de ADN de TNRs y la señal emitida en un ensayo de ELISA que permite establecer valores de corte normal y patológico, así como cuantificar el número total de citidinas (marcadas *in vitro*, no enzimáticamente) mediante el uso de un conjunto de ecuaciones.

La tesis está estructurada en ocho capítulos: (1) Introducción, en la que se abordan los aspectos esenciales sobre los diferentes métodos de marcaje de ADN, así como los procedimientos diseñados para el diagnóstico molecular de enfermedades caracterizadas por TNRs, a través de sondas de ADN marcadas. Se plantea el problema científico y la hipótesis del trabajo, se describen los objetivos de forma detallada y se explica la importancia práctica, el alcance social, así como la novedad científica. (2) Revisión Bibliográfica, en la cual se hace una reseña histórica de los diferentes métodos de marcaje de ADN, tanto *in vivo*, como *in vitro* y se describe cada uno de ellos, como un instrumento del desarrollo de la genómica. También se aborda el tema de las enfermedades neurodegenerativas y dentro de estas, las caracterizadas por TNRs, así como una descripción histórica de los principales métodos de diagnóstico molecular para este tipo de enfermedades y se dedica un espacio especial a las SCA. Este capítulo al final contiene además, las consideraciones generales relacionadas. (3) Parte Experimental, incluye los materiales, reactivos y procedimientos empleados para el marcaje de ADN, tanto *in vivo* como *in vitro*, así como otros aspectos generales. (4) Resultados y Discusión, en este capítulo se concentran los resultados del marcaje de ADN tanto *in vivo* como *in vitro*, a través de los diferentes métodos empleados, así como los referentes al diagnóstico de las expansiones CAG en SCA2 y SCA3, se aportan los cálculos de las eficiencias de marcaje *in vitro* de las secuencias de TNR, y la estrategia para la cuantificación de repetidos CAG. (5) conclusiones, (6) recomendaciones, (7) Referencias Bibliográficas y (8) Anexos. También se muestra una síntesis y la autobibliografía relacionada con el tema de la tesis. Todos estos aspectos se desarrollan en 124 páginas, en las que se incluyen 255 referencias bibliográficas, seis esquemas, seis tablas y 21 figuras. El 18 % de la bibliografía corresponde a los últimos cinco años (2006-2010), el 17 % al quinquenio 2001-2005, el 25 % a los años entre 1996 y 2000, el 16 % al período 1991-1995 y hasta 1990, el 26 %. De forma global, el 36 % de la bibliografía corresponde a los últimos 10 años.

Los resultados que se recogen en este trabajo forman parte de tres artículos publicados en revistas de alto factor de impacto como *Preparative Biochemistry & Biotechnology* y *Journal of Neuroscience Methods*; tres resúmenes ampliados publicados en revistas de alto factor de impacto como *VACCINE*, *Journal of Neurochemistry* y *Clinical Investigative of Medicine*; un resumen ampliado publicado en la Revista Cubana de Química y dos artículos en la Revista CENIC Ciencias Biológicas. El trabajo en sus distintas facetas ha sido también expuesto en 20 congresos en Cuba y seis presentaciones en el extranjero.

La novedad científica del presente trabajo radica en el desarrollo de una nueva metodología para la cuantificación de repetidos CAG en moléculas de ADN, con el empleo de sondas marcadas *in vitro* con el radical *p*-bromobenzoílo, mediante reacciones de transaminación-acilación de las moléculas de citidina del ADN. Por otra parte, el método propuesto es extensible al diagnóstico de otras enfermedades genéticas en las que la citidina esté implicada en la mutación.

Este novedoso método para el diagnóstico de repetidos CAG, una vez realizada su validación clínica, será de fácil implementación en cualquier laboratorio dedicado al diagnóstico clínico sobre plataforma de ELISA. El ensayo no requiere recursos especiales, es sencillo y rápido, ya que el marcaje es no enzimático y estéreo-específico con marcas de producción nacional, a bajos costos de obtención. Su grado de aplicación se verá revelado a través del diagnóstico molecular de distintas patologías genéticas causadas por expansiones de TNRs. La nueva alternativa permitirá realizar además, el análisis de un elevado número de muestras, a precios relativamente bajos y con posibilidades de automatización.

El alcance social del presente trabajo se manifiesta a través del aporte de una nueva metodología a la Red de Salud Nacional del Ministerio de Salud Pública de Cuba, para el diagnóstico de repetidos CAG y en un futuro lograr el pesquiasaje masivo de las poblaciones afectadas, de forma rápida, sencilla y a bajo costo, para su tratamiento y seguimiento adecuados. Su introducción contribuirá a elevar la calidad de vida de la población cubana y a evitar los traumas familiares y sociales asociados con el padecimiento de enfermedades neurodegenerativas y genéticas caracterizadas por expansiones de TNRs.