

Título: Técnica mininucleon-IIb de aislamiento de ADN: implementación, generalización, valoración económica e impacto en la atención e investigación de las ataxias y neurodegeneraciones genéticas.

Autores: Lic. José Miguel Laffita Mesa (laffita@ataxia.hlg.sld.cu), Lic. Yanetza González Zaldívar, Lic. Yobanis Rodríguez Almira, DrC. Luís Almaguer Mederos, MSc. Dennis Almaguer Gotay, Lic. Alex Miranda, MSc. Dany Cuello Almarales, Dra. Dania Vázquez Blompkist, MSc. Yaimee Vázquez Mojena, Lic. Ridel Alian Rodríguez Mora. Lic. Maricela Pascual Acosta, Dr.Cs. Luís Velásquez Pérez.

Centro de procedencia del autor principal: Centro para la Investigación y Rehabilitación de las Ataxias Hereditarias, CIRAH de Holguín.

Palabras clave: enfermedades degenerativas, Ataxias hereditarias, neurodegeneraciones genéticas.

PREMIO EN LA INSTANCIA PROVINCIAL DEL CONCURSO, AÑO 2013.

CATEGORÍA: INNOVACIÓN TECNOLÓGICA

Introducción.

Un número considerable de enfermedades neurodegenerativas heredables son causadas por expansiones del triplete CAG en la región codificante del gen respectivo. Estas mutaciones resultan en la expansión de un dominio poliglutamínico por encima de cierto umbral. Los desórdenes genéticos definidos por este tipo de mutación se incluyen dentro de las enfermedades poliglutamínicas, este grupo incluye a las ataxias espinocerebelosas (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17, DRPLA, SBMA y la enfermedad de Huntington). Además existen otras ataxias como la de Freidereich que es causada por expansiones del triplete GAA en el gen de Frataxina, sin embargo, el fundamento molecular es diferente respecto al de las enfermedades poliglutamínicas por encontrarse la mutación, en una región no codificante lo que interfiere con la expresión normal de la correspondiente proteína.

El debut de los principales signos clínicos es alrededor de los 30 años e inexorablemente estas enfermedades son fatales. De lo anterior se infiere que gran parte de la vida económica, social y personal de los afectados así como de los familiares o tutores a cargo del paciente es impactada negativamente. Para todas las mutaciones causantes de estos desórdenes, se le ha asignado sitios cromosómicos y han sido definidos molecularmente, lo que brinda la oportunidad de diagnosticar el estatus de portador en estadios asintomáticos, sintomáticos y prenatales. Esto brinda la oportunidad del diagnóstico presintomático de todas estas enfermedades, por lo que la molécula diana para todos estos ensayos es el ADN.

Durante más de 5 años el ADN se obtenía a partir de 10 ml de sangre mediante el método Nucleon IIB. El uso de estos volúmenes limitaba la procesatividad y era relativamente costoso. Se propuso disminuir los volúmenes así como el tiempo de extracción del ADN y la automatización del método mediante la conservación de la relación de los volúmenes de muestras respecto al de los reactivos usados.

Objetivos.

- a)** Desarrollar variantes del método nucleon IIB para extraer ADN a partir de 500, 250, 100, y 50µl de sangre.
- b)** Determinar los parámetros físicos de pureza, concentración del ADN obtenido por el método optimizado a microvolúmenes (mini).
- c)** Comprobar la utilidad del ADN extraído por el método mini.
- d)** Validar la funcionalidad y versatilidad del método así como las ventajas técnicas del método.

Materiales y métodos.

El trabajo incluye un estudio piloto en un período de 1 año (2003). Posteriormente se realizó una fase de validación y de aplicación del método estandarizado en muestras de sangre periférica (2004-2012). Mediante varias técnicas de análisis genético se prueba la utilidad del método y se evalúa la

eficiencia económica del método desarrollado. El trabajo incluye la aplicación del método en el aislamiento de ~6000 muestras de ADN, así como la determinación de sus parámetros físico-químicos usando tecnología considerada como estándar dorado para este tipo de estudio Ej. Fluorospectrofotometro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Montchanin, DE). Se evalúa la aplicabilidad del ADN aislado usando varias estrategias como la secuenciación de genes, el análisis de mutaciones dinámicas, digestiones enzimáticas, High Resolution Melting analysis... Se compara el rendimiento del método con el usado tradicionalmente así como con el comercializado por Qiagen. Se valúa el efecto económico de su introducción en la investigación y atención de varias neurodegeneraciones genéticas.

Resultados y discusión.

El método mini rindió concentraciones de ADN significativamente superior a técnicas similares de uso comercial ($545.7 \pm EEM112.24$ ng/ μ l vs $20.26 \pm EEM 2.45$ ng/ μ l, Kruskal-Wallis, $p \leq 0.0000$) y comparable al método tradicional ($545.7 \pm EEM112.24$ ng/ μ l vs $1366.8 \pm EEM475.16$ ng/ μ l, Kruskal-Wallis, ns). Los valores de pureza fueron altos ($Abs_{260/280} = 1.77 \pm 0.03$), acercándose a parámetros estándares, más aceptables que el tradicional y el método DNeasy de Qiagen ($H: 2, N=134$) = 29.98, $p \leq 0.0000$).

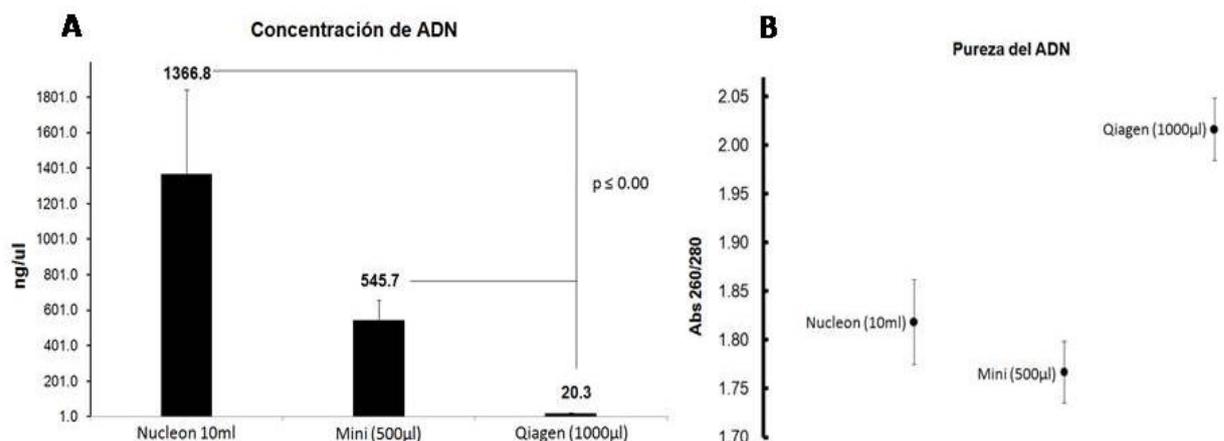


Fig. 1. Comparación de los parámetros de pureza y concentración de ADN. A) Se muestran los valores de concentración de ADN de los tres métodos analizados y el volumen de muestra inicial. El método mini muestra valores comparables con el tradicional pero superior al Kit DNeasy de Qiagen. B) La pureza del ADN expresada como r_{ln} Abs. 260/280, donde el método mini se aproxima mucho más al valor ideal de 1.7 y mostró mayor pureza.

Bajo este proceder, en el departamento se han diagnosticado pacientes SCA2 (163 familias). Los cromatogramas de los análisis de fragmentos muestran niveles de fluorescencia detectables y fácilmente identificables como se muestra en la Fig. 3. Además, dada la similitud en cuanto a la lesión genética entre SCA2 y otras poliglutaminopatías, también hemos diagnosticado casos de enfermedad de Huntington (60 casos), SCA1 (3 casos), SCA7 (2 casos), SCA3 (12 casos), SCA17 (1 caso) y Ataxia Freidereich (6 casos).

Además, probamos la utilidad del ADN aislado para detectar metilación del ADN de varios genes como el ATXN2.

En nuestro Dpto. evaluamos la hipótesis de una posible asociación de genotipos de enzimas involucradas en el balance redox, tales como Glutación-S-Transferasa –GST-, la Súper Óxido Dismutasa -SOD1- y la Catalasa -CAT-. Para esto usamos la técnica de RFLP (del inglés Restriction Length Polymorphisms) en 130 casos, en un estudio de tipo caso-control, emparejado por edad y sexo. En la tabla 1 presentamos los resultados genotípicos. Aquí no presentamos la relación de estas variables con las actividades enzimáticas en SCA2 porque es materia de otro trabajo.

Tabla 1. Genotipo de enzimas asociadas al estrés oxidativo.

GSTO1	Frecuencia (%)	GSTO2	Frecuencia (%)	SOD1	Frecuencia (%)	CAT	Frecuencia (%)
AA	13 (10)	AA	78 (61)	AA	85 (94.4)	AA	8 (8.8)
AC	60 (46)	AG	43 (33.6)	AC	5 (6.6)	AT	44 (48.4)
CC	57 (44)	GG	7 (5.5)	CC	0 (0)	TT	39 (42.8)
Total	130	--	128	--	90	--	91

La mutación G2019S en el locus PARK8, es la causa más común de EP familiar, de tipo Autosómico Dominante (Goldwurm et al., 2005, Corti et al., 2011). Bardien et al., 2010 demostraron que el análisis mediante HRM (del inglés *High Resolution Melting*) fue efectivo en la detección de la mutación G2019S. Estos autores prescindieron de la secuenciación en 205 pacientes EP de Sur-África, reduciendo los costos y tiempo análisis. Existen condiciones

ideales para una correcta identificación de las variantes genéticas, y la fundamental es la calidad del ADN (presencia de contaminantes y proteínas unidoras de ADN), así como su concentración. El desempeño del método HRM fue evaluado en 100 pacientes de EP, a los cuales se le extrajo ADN mediante la técnica mininucleon-IIb en el CIRAH, y el ADN mostró una pureza de 1.7 que es lo óptimo para cualquier análisis molecular. Se encontró que la mutación p.G2019S en LRRK2 representaba el 13% de la muestra. Este valor es alto y cae dentro de los reportados (Lesage y Brice., 2009), con una presencia considerable de esta mutación comparado con Bardien et al., 2010, que reportan un 2.5%.

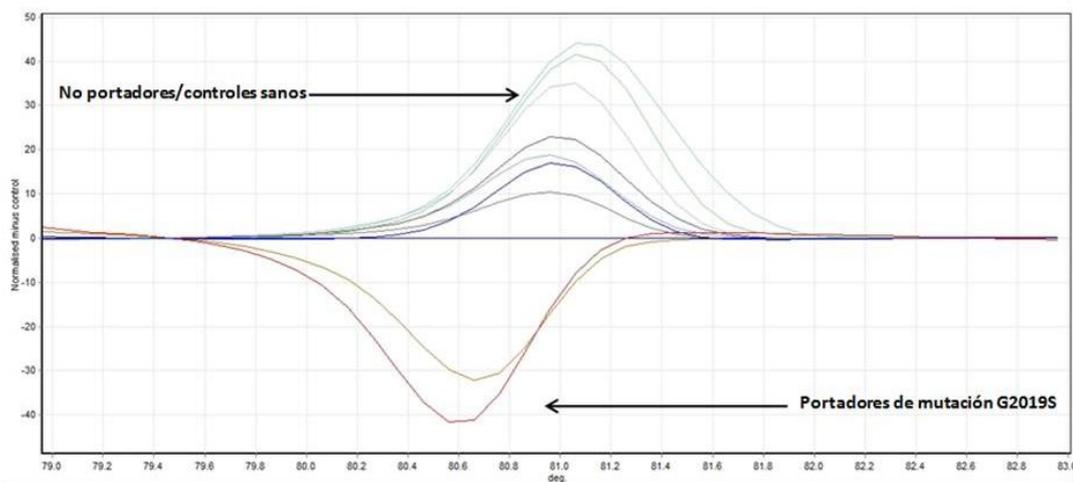


Fig. 6. Análisis de curvas de disociación ó HRM en muestras EP y controles en el gen LRRK2. Se muestran dos comportamientos, mutante y no portador. Se diferencian por las temperaturas de melting en el eje X.

El análisis de las partidas de gastos directos de ambos métodos arrojó que la técnica mini-nucleon-IIb incurrió en un gasto de 21.38MLC y la Nucleon IIb 62.53, lo que representa un ahorro unitario de 41.15MLC. Atendiendo a esto último, se compensó el equivalente a 6.43 años de insumos importados, a razón de 37000 MLC que es el gasto anual correspondiente a reactivos de biología molecular en el CIRAH (dígame Taq-Polimerasa, dNTPs, oligos, geles de poliacrilamida...). El ahorro neto de 356 247.72 pesos, y el tiempo compensado fue de 7.5 años.

Este método es ampliamente usado en el laboratorio dado su versatilidad así como del número de muestras que se pueden procesar en serie en una jornada laboral por un técnico (hasta 60 en un día de trabajo, contra 20 con el método tradicional). Hasta el momento más de 5000 muestras han sido procesadas usando este método, el cual ha sido insertado en el flujo general de trabajo del laboratorio de genética molecular. También ha garantizado los resultados moleculares para todas las investigaciones realizadas en la institución. Teniendo en cuenta que se pueden usar hasta 50ul de sangre este método permite la obtención de ADN a partir de filtros de papel impregnados con sangre, estudios de personas ancianas o en edad pediátrica sin la necesidad de usar costosos kits comerciales diseñados al efecto. Finalmente, con el uso de este método unido a otros como el haplotipaje y la técnica múltiple de PCR también implementada por los autores, ha facilitado identificar la susceptibilidad genética de familias o personas no relacionadas con las familias SCA2 cubanas, a la vez que disminuye el tiempo de análisis de múltiples genes en grandes series de casos si se inserta en el flujo de PCR multiplex. Además su introducción, implementación y posterior generalización en la investigación y asistencia de las ataxias hereditarias ha demostrado ser útil disminuyendo el tiempo de análisis, costo en el uso de equipos y reactivos así como aumenta el número de muestras procesadas, brindándole mejor ergonomía al tecnólogo involucrado en la actividad.

Conclusiones.

1. La modificación del método de aislamiento de ADN disminuyó significativamente los volúmenes de trabajo (10ml a 500ul, 250, 100 y 50 ul) con la consecuente mejora de la eficiencia del diagnóstico molecular y la atención a pacientes con enfermedades genéticas.
2. El método rinde un ADN de alta pureza y concentración, útil para el análisis de enfermedades genéticas mediante el uso de varias plataformas de trabajo tales como la secuenciación, el Análisis de fragmento, la digestión enzimática, la PCR en tiempo real y el HRM.
3. La introducción e implementación del método en el período 2003-2012 aportó un ahorro significativo en la importación de reactivos, así como

disminuyó el tiempo de análisis de muestras de ADN para ser diagnosticadas en el laboratorio de biología molecular del CIRAH, sugiriendo considerables ventajas en tiempo, costo/beneficio, versatilidad y calidad del analito obtenido.

4. Este método desplazó al tradicional en uso en el laboratorio y fue superior en cuanto a parámetros de concentración y pureza respecto a otros disponibles en el mercado.

Referencias Bibliográficas.

1. Bardien S, Marsberg A, Keyser R, Lombard D, Lesage S, Brice A, Carr J. LRRK2 G2019S mutation: frequency and haplotype data in South African Parkinson's disease patients. *J Neural Transm.* 2010; 117(7):847-853.
2. Corti O, Lesage S, and Brice A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's Disease. *Physiol Rev* 2011;91: 1161–1218.
3. Goldwurm S, Di Fonzo A, Simons EJ et al., The G6055A (G2019S) mutation in LRRK2 is frequent in both early and late onset Parkinson's disease and originates from a common ancestor. 2005. *J Med Genet* 42:e65.
4. Lesage S and Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Gen.* 2009. Vol. 18, R48–R59. doi:10.1093/hmg/ddp012.