

Mtra. María Elena Contreras Garfias  
 Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
 PRESENTE



Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
	4	12	2020				

### Datos del Alumno

Nombre : Fernando Gonzalez Ojeda	
Matrícula : 2143025201	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
Domicilio : Cuauhtemoc Mz. 2 Lt. 12, Col. Acuitlapilco, Chimalhuacán, estado de México.	
Teléfono : 5558521588	Celular : 5514710077
Correo Electrónico : nf_gonzalez@hotmail.com	CURP : GOOF900621HDFNJR

### Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Estudio molecular de los genes GCH1 y TH en pacientes con distonía y parkinsonismo							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : Laboratorio de Genética Molecular N-103 / Departamento de Genética							
Dependencia : Departamento de Sistemas Biológicos, UAM Xochimilco / Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía							
Entidad Federativa : Distrito Federal							
Municipio : Coyoacán	Localidad : Villa Quietud						
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	29	4	2019		28	11	2019

### PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 3.- Público	Tipo: 2.- Interno
Orientación: 8.- Salud, Alimentación Y Nutrición	

### FIRMAS

Dra. Marisol López López, No. E. 7808; Dr. Alberto Ortega Vázquez, No. E. 35583

Asesor Interno  
 Nombre, firma y No. Económico

Fernando Gonzalez Ojeda, Matrícula: 2143025201

Alumno  
 Nombre, firma

Dra. Nancy Monroy Jaramillo, CP: 09136591

Asesor Externo  
 Nombre, firma y No. Económico

M. en C. Alma Elena Ibarra Cázares No. E. 32807

Vo. Bo. de la Comisión  
 Nombre y firma de la persona que autoriza



Ciudad de México a 22 de enero del 2020

**MTRO. JESÚS OBDULIO LÓPEZ MURILLO**  
**COORDINADOR DIVISIONAL DE SERVICIO SOCIAL**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto se hace de su conocimiento que el alumno **FERNADO GONZÁLEZ OJEDA**, con número de matrícula 2143025201, de la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, ha concluido satisfactoriamente su **SERVICIO SOCIAL** bajo la tutoría de la Dra. Nancy Monroy Jaramillo del Departamento de Genética en este instituto, participando en el proyecto titulado: *“Evaluación clínica y molecular de pacientes con distonía DYT1, DYT5a, DYT5b, DYT6, DYT12 y DYT16”*. El cual se llevó a cabo del 29 de abril al 28 de noviembre del 2019, de lunes a viernes con un horario 9 a 17 horas.

Participando en las siguientes actividades:

- Extraer DNA genómico a partir de muestras de sangre total.
- Evaluar DNA genómico cualitativa y cuantitativamente.
- Estandarizar reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) para exones de los genes GCH1 y TH.
- Realizar electroforesis horizontales para identificación de amplicones.
- Realizar reacción de secuenciación tipo Sanger para la identifican de variantes genéticas.

Sin más por el momento, envío un cordial saludo.



**A T E N T A M E N T E**

**LIC. ÁNGEL EDUARDO RIVERA PANTOJA**  
**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PREGRADO Y POSGRADO**  
**DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA**

Nota: la fecha de emisión corresponde a la entrega de su reporte de actividades y solicitud de este documento.





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Ciudad de México a 3 de diciembre de 2020.

Dr. Juan Esteban Barranco Florido  
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos  
PRESENTE

Estimado Dr. Barranco,

Me dirijo a usted atentamente para comunicarle que el alumno Fernando Gonzalez Ojeda, con matrícula 2143025201, concluyó el proyecto de Servicio Social "Estudio molecular de los genes GCH1 y TH en pacientes con distonía y parkinsonismo", que realizó en el Laboratorio de Genética Molecular N-103 del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM-X y en el Departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" (INNNMVS) del 29 de abril de 2019 al 28 de noviembre de 2019 cumpliendo un total de 480 horas.

Atentamente,

---

Dra. Marisol López López  
Prof. Titular "C" T.C.

c.c.p. Mtra. María Elena Contreras Garfias

Directora de la DCBS UAM-X





Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
Unidad Xochimilco

NOMBRAMIENTO DE ASESOR  
30 de noviembre del 2020

CSS/DCBS/I-085/2019

**DRA. MARISOL LOPEZ LOPEZ**  
ASESOR INTERNO  
Presente

Informo a usted que con base en el artículo 17 y 18 del Reglamento de Servicio Social a Nivel Licenciatura de la UAM, ha sido designada asesora responsable de **FERNANDO GONZALEZ OJEDA**, con matrícula **2143025201** de la licenciatura en **QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGICA**, para que bajo su supervisión y aprobación, evalúe el cumplimiento de ésta prestación que se llevará a cabo a partir del **29 de Abril de 2019** al **28 de Noviembre de 2019** en **SECRETARIA DE SALUD, INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y NEUROCIRUGIA, Y EN EL LABORATORIO DE GENETICA MOLECULAR N-103 DE LA UAM- X**, con clave y denominación:

**ESTUDIO MOLECULAR DE LOS GENES GCH1 Y TH EN PACIENTES CON DISTONIA Y PARKINSONISMO**

Le agradeceré que con base en este nombramiento y bajo su aprobación, se cumplan los requerimientos y objetivos propuestos del proyecto y se entregue el informe final, establecido en el artículo 29 del Reglamento citado, de las actividades realizadas por el prestador.

Sin otro particular, agradezco su atención.

**Atentamente**  
**Casa abierta al tiempo**

*P.A. Patricia Enjaldo*

**MTRA. MARIA ELENA CONTRERAS GARFIAS**  
DIRECTORA DE LA DIVISIÓN



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

Ciudad de México a 4 de diciembre de 2020.

Dr. Juan Esteban Barranco Florido  
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos  
PRESENTE

Estimado Dr. Barranco,

Me dirijo a usted atentamente para comunicarle que el alumno Fernando González Ojeda con matrícula 2143025201, concluyó el proyecto de Servicio Social "Estudio molecular de los genes GCH1 y TH en pacientes con distonía y parkinsonismo" el cual realizó en el Laboratorio de Genética Molecular N-103 del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM-X y en Departamento de Neurogenética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez del 29 de abril del 2019 al 28 de noviembre 2019, cumpliendo un total de 480 horas.

Atentamente,

---

Dr. Alberto Ortega Vázquez  
Prof. Asociado "D" T.C.

C.c.p. Mtra. María Elena Contreras Garfias. Directora de la DCBS UAM-X





Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Xochimilco**

NOMBRAMIENTO DE ASESOR  
12 de junio del 2019

CSS/DCBS/I-085/2019

**DR. ALBERTO ORTEGA VAZQUEZ**  
**PROFESOR-INVESTIGADOR**

Presente

Informo a usted que con base en el artículo 17 y 18 del Reglamento de Servicio Social a Nivel Licenciatura de la UAM, ha sido designado asesor responsable de **FERNANDO GONZALEZ OJEDA**, con matrícula **2143025201** de la licenciatura en **QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGICA**, para que bajo su supervisión y aprobación, evalúe el cumplimiento de ésta prestación que se llevará a cabo a partir del **29 de Abril de 2019** al **28 de Noviembre de 2019** en **SECRETARIA DE SALUD, INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y NEUROCIROLOGIA**, con clave y denominación:

**ESTUDIO MOLECULAR DE LOS GENES GCH1 Y TH EN PACIENTES CON DISTONIA Y PARKINSONISMO**

Le agradeceré que con base en este nombramiento y bajo su aprobación, se cumplan los requerimientos y objetivos propuestos del proyecto y se entregue el informe final, establecido en el artículo 29 del Reglamento citado, de las actividades realizadas por el prestador.

Sin otro particular, agradezco su atención.

**Atentamente**  
**Casa abierta al tiempo**

  
**MTRA. MARIA ELENA CONTRERAS GARFIAS**  
**DIRECTORA DE LA DIVISIÓN**



Ciudad de México a 4 de diciembre de 2020.

**Dr. Juan Esteban Barranco Florido**  
**Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos,**  
**Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco**

Por medio de esta carta me permito informar a usted, que el alumno Fernando Gonzalez Ojeda con matrícula 2143025201, de la carrera Químico Farmacéutico Biólogo concluyó satisfactoriamente su Servicio Social, cumpliendo las 480 horas reglamentarias, con el protocolo a mi cargo "Estudio molecular de los genes *GCH1* y *TH* en pacientes con distonía y parkinsonismo", en el periodo comprendido del 29 de abril de 2019 al 28 de noviembre de 2019.

Por tal motivo, y a petición del p.QFB Gonzalez, se extiende la presente carta para liberación de su Servicio Social.

Sin otro particular, quedo a sus órdenes para aclarar cualquier duda relacionada con este asunto. Aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,



Dra. Nancy Monroy Jaramillo

Investigador en Ciencias Médicas D. SNI nivel II

Departamento de Genética, INNNMVS

Tel: 55 5606 3822 Ext. 2018. [nancy.monroy@innn.edu.mx](mailto:nancy.monroy@innn.edu.mx)







Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
Unidad Xochimilco

NOMBRAMIENTO DE ASESOR  
12 de junio del 2019

CSS/DCBS/I-085/2019

**DRA. NANCY MONROY JARAMILLO**  
**ASESOR EXTERNO RESPONSABLE**  
Presente

Informo a usted que con base en el artículo 17 y 18 del Reglamento de Servicio Social a Nivel Licenciatura de la UAM, ha sido designada asesora responsable de **FERNANDO GONZALEZ OJEDA**, con matrícula **2143025201** de la licenciatura en **QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGICA**, para que bajo su supervisión y aprobación, evalúe el cumplimiento de ésta prestación que se llevará a cabo a partir del **29 de Abril de 2019** al **28 de Noviembre de 2019** en **SECRETARIA DE SALUD, INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y NEUROCIROGIA**, con clave y denominación:

**ESTUDIO MOLECULAR DE LOS GENES GCH1 Y TH EN PACIENTES CON DISTONIA Y PARKINSONISMO**

Le agradeceré que con base en este nombramiento y bajo su aprobación, se cumplan los requerimientos y objetivos propuestos del proyecto y se entregue el informe final, establecido en el artículo 29 del Reglamento citado, de las actividades realizadas por el prestador.

Sin otro particular, agradezco su atención.

**Atentamente**  
**Casa abierta al tiempo**

  
**MTRA. MARIA ELENA CONTRERAS GARFIAS**  
**DIRECTORA DE LA DIVISIÓN**





**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO**

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica**

Informe de Servicio Social

**Estudio molecular de los genes *GCH1* y *TH* en  
pacientes con distonía y parkinsonismo**

Fernando Gonzalez Ojeda

Asesores internos: Dra. Marisol López López

Dr. Alberto Ortega Vázquez

Asesor externo: Dra. Nancy Monroy Jaramillo

Fecha: 04 de diciembre de 2020

# 1. CONTENIDO

---

1.	CONTENIDO.....	2
2.	DATOS GENERALES .....	3
3.	LUGAR Y PERIODO DE REALIZACIÓN .....	3
4.	PROCEDENCIA .....	3
5.	ASESORES .....	3
6.	INTRODUCCION .....	4
7.	OBJETIVOS .....	5
a.	Objetivo General .....	5
b.	Objetivos específicos .....	5
8.	MARCO TEÓRICO.....	6
c.	Distonía .....	6
d.	Distonías aisladas y combinadas .....	7
e.	Distonías combinadas con parkinsonismo .....	9
f.	Genética de las distonías respondedoras a dopamina (DRD) .....	10
g.	Secuenciación tipo Sanger .....	12
9.	METODOLOGÍA.....	13
a.	Sujetos de estudio .....	13
b.	Extracción de DNA genómico .....	14
c.	Amplificación de genes <i>GCHI</i> y <i>TH</i> por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	15
d.	Secuenciación de los amplicones .....	18
e.	Análisis de secuencias .....	19
10.	ACTIVIDADES REALIZADAS.....	19
11.	RESULTADOS .....	20
f.	Selección de DNA genómico para el análisis de <i>GCHI</i> y <i>TH</i> .....	20
g.	Estandarización de PCR.....	21
h.	Secuenciación tipo Sanger .....	24
12.	DISCUSIÓN .....	26
13.	CONCLUSIONES.....	28
14.	RECOMENDACIONES.....	28
15.	REFERENCIAS .....	29
16.	ANEXOS.....	31
i.	Anexo 1. Consentimiento informado .....	31
j.	Anexo 2. Amortiguador SB .....	34



## **2. DATOS GENERALES**

---

Alumno: Fernando Gonzalez Ojeda

Matrícula: 2143025201

Proyecto Genérico: Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos.

Etapas: Diseño y desarrollo de productos biológicos por métodos biotecnológicos o de ingeniería genética.

## **3. LUGAR Y PERIODO DE REALIZACIÓN**

---

El servicio social se realizó en el Departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNNMVS) y en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Sistemas Biológicos de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, participando en el proyecto titulado “Evaluación clínica y molecular de pacientes con distonía DYT1, DYT5a, DYT5b, DYT6, DYT12 y DYT16”, el periodo del mismo fue del 29 de abril de 2019 al 28 de noviembre de 2019 con una duración de 480 horas.

## **4. PROCEDENCIA**

---

Alumno de la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica perteneciente a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

## **5. ASESORES**

---

Asesores internos: Dra. Marisol López López, Profesor Titular “C” TC y el Dr. Alberto Ortega Vázquez, Profesor asociado “D” TC. UAM Unidad Xochimilco.

Asesor externo: Dra. Nancy Monroy Jaramillo, Investigador en Ciencias Médicas “D” del Departamento de Genética del INNNMVS.

## 6. INTRODUCCION

---

Las distonías son trastornos del movimiento que pueden presentarse de manera hereditaria o de manera esporádica y mostrar cuadros clínicos heterogéneos combinados con parkinsonismo complicando el diagnóstico clínico.

Las distonías DYT/PARK-GCH1 (DYT5a) y DYT/PARK-TH (DYT5b) tienen buena respuesta a dopamina y pueden presentar cuadros mixtos y heterogeneidad fenotípica, por lo que suelen confundirse con enfermedad de Parkinson. En este contexto, la identificación de las variantes genéticas patogénicas permitirá dar un diagnóstico de certeza, así como el adecuado asesoramiento genético tanto para los pacientes como para sus familiares de riesgo y un tratamiento oportuno.

Actualmente no existen publicaciones sobre la prevalencia y tipo de mutaciones asociadas a distonías combinadas en la población mexicana, por lo que en este trabajo se estudiaron y documentaron la prevalencia y tipo de mutaciones en pacientes diagnosticados clínicamente con distonías DYT5a y DYT5b.

El análisis de las secuencias obtenidas por el método Sanger de los exones de *TH* evidenció la presencia de dos variantes intrónicas y una de sentido erróneo, consideradas como nuevas, debido a que no existe información precedente sobre las mismas en las bases de datos consultadas, lo que dificulta aseverar su importancia clínica y sus porcentajes de frecuencia.

El fenotipo relacionado a DRD se explica por las variantes probablemente dañinas en el 10% (n=19) de los pacientes estudiados.



## 7. OBJETIVOS

---

### a. Objetivo General

Determinar la prevalencia y tipo de mutaciones en los genes *GCHI* y *TH* en pacientes con cuadros mixtos de distonías y parkinsonismo.

### b. Objetivos específicos

- Seleccionar las muestras de DNA genómico que cumplan con los criterios de pureza y concentración para la amplificación por método de PCR.
- Estandarizar las condiciones de temperatura y reactivos para la realización de las PCR.
- Realizar la amplificación de los exones pertenecientes a *GCHI* y *TH* por método de PCR.
- Analizar la secuencia de los genes *GCHI* y *TH* en pacientes con diagnóstico clínico de distonía con parkinsonismo.
- Analizar la dosis de los genes *GCHI* y *TH* en pacientes con diagnóstico clínico de distonía con parkinsonismo.

## 8. MARCO TEÓRICO

---

### c. Distonía

La distonía es un grupo de trastornos del movimiento con estimación de prevalencia de 16:100,000, caracterizado por contracciones musculares excesivas sostenidas o intermitentes que producen movimientos repetitivos, posturas anormales o ambos, y puede presentarse con patrón de torsión y temblor (Albanese et al. 2013; Lohmann & Klein, 2017; Ospina-García et al. 2018).

La distonía es un trastorno altamente heterogéneo en sus manifestaciones clínicas y en sus orígenes etiológicos, puede ser clasificada por medio de características que se dividen en dos ejes, el primer eje abarca características clínicas como la edad de inicio, la distribución corporal, el patrón temporal y la coexistencia con otras alteraciones neurológicas, el segundo eje se basa en la etiología de la distonía abarcando patologías del sistema nervioso y causas hereditarias o adquiridas (Ospina-García et al. 2018; Jinnah & Sun, 2019).

Considerando la clasificación por manifestaciones clínicas, las características distónicas pueden presentarse a cualquier edad, de aquí, que la edad de inicio es importante para su clasificación, en los casos de distonía de inicio en la infancia existen más probabilidades de identificar el gen causal que en los casos de inicio en etapa adulta (Jinnah & Sun, 2019).

Al considerar la distribución corporal, la distonía puede afectar una, varias o muchas partes del cuerpo de manera que se pueden clasificar como distonía focal, segmentarias o generalizadas, respectivamente. En algunos casos la distonía focal puede extenderse para afectar otras partes del cuerpo o incluso, generalizarse con el tiempo (Lohmann & Klein, 2017; Balint et al. 2018).

La distonía generalizada es considerada la forma más severa, afectando a un gran número de músculos de todo el cuerpo, aunque su incidencia es rara; las distonías segmentarias son menos severas y afectan regiones adyacentes del cuerpo. Finalmente, las distonías focales, principalmente involucran a los músculos del cuello, la cara, la laringe o una extremidad y son consideradas las formas de distonía más comunes (Balint et al. 2018; Jinnah & Sun, 2019).

La distonía es un trastorno que puede variar con el tiempo, algunas distonías son relativamente estáticas durante años, algunas tienen una progresión lenta y otras avanzan de manera gradual (Jinnah & Sun, 2019).

Aunque la mayor parte de los pacientes con distonía se clasifican como esporádicos, los factores genéticos son fundamentales en el desarrollo de las distonías. Actualmente, más de 200 genes se han relacionado con diferentes formas de distonía que pueden presentarse de



manera aislada o en combinación con otros trastornos del movimiento (Albanese et al. 2013; Lohmann & Klein, 2017).

Los patrones de herencia también permiten dilucidar las manifestaciones distónicas, algunos tipos de distonías presentan un patrón de herencia autosómica dominante. Aunque comúnmente tienen baja penetrancia, por consiguiente, no todos los portadores de la mutación presentarán el fenotipo, aunque potencialmente si pueden transmitirla a su descendencia. Las distonías también pueden heredarse de manera autosómica recesiva o ligada al cromosoma X (Ospina-García et al. 2018).

La clasificación de la distonía por características genéticas incluye datos moleculares (*loci* o regiones cromosómicas asociadas a distonía sin haber identificado el gen causal), genes asociados, patrones de herencia, y manifestaciones clínicas, permitiendo diferenciar 29 *loci* denominadas DYT1 a DYT29 (Tabla 1), de acuerdo a su fecha de descripción, aunque algunas han sido descartadas debido a que existían *loci* repetidos (DYT9=DYT18, DYT14=DYT5) o sin gen categorizado (DYT22) (Klein, 2014; Xiao et al. 2014; Arango, 2017).

#### **d. Distonías aisladas y combinadas**

Las formas en las que la distonía es la única característica motora son conocidas como distonías aisladas (denominadas anteriormente como distonías primarias) y están relacionadas con desórdenes idiopáticos y variantes genéticas en los *loci* DYT1, DYT4 y DYT6, siendo heredadas de forma autosómica dominante con penetrancia incompleta secundarias a mutaciones en los genes *TORIA*, *TUBA4* y *THAP1*, respectivamente (Klein, 2014; Ospina-García et al. 2018).

Las formas en que las características clínicas de la distonía se combinan con otras alteraciones del movimiento son denominadas como distonías combinadas (denominadas anteriormente como distonía-plus), las variantes genéticas en los *loci* DYT5a y b, DYT3, DYT12 y DYT16 generalmente se acompañan de parkinsonismo; mientras que los *loci* DYT11, DYT15 y DYT26 se asocian con mioclonías, DYT4 con corea y los *loci* DYT8, DYT10, DYT18, DYT19 y DYT20 se relacionan con discinesias paroxísticas (Klein, 2014; Arango, 2017; Lohmann & Klein, 2017; Ospina-García et al. 2018).

**Tabla 1.** Clasificación de las distonías, (extraída de Arango, 2017).

Categoría clínica	Designación	Características clínicas	Locus	Gen	Herencia
<b>Distonías aisladas</b>					
-Distonías persistentes					
1. Distonías de inicio en infancia y adolescencia	DYT 1	Distonía generalizada primaria de inicio temprano	9q	<i>TOR1-A o DYT 1</i>	AD
	DYT 2	Distonía idiopática autosómica recesiva	-	-	AR
	DYT 6	Distonía mixta	8p	<i>THAP1 o DYT6</i>	AD
	DYT 13	Distonía primaria segmentaria craneocervical de inicio temprano	1p	-	AD
	DYT 17	Distonía primaria idiopática autosómica recesiva	20pq	-	AR
	DYT 27	Distonía aislada de inicio temprano	2q	<i>COL6A3</i>	AR
	DYT 28	Distonía de inicio en la infancia -28	19p13	<i>KMT2B</i>	AD
2. Distonías de inicio en el adulto	DYT 7	Distonía focal de inicio en el adulto	18p	-	AD
	DYT 21	Distonía focal autosómica dominante de inicio tardío	2q	-	AD
	DYT 23	Distonía cervical primaria de inicio en el adulto	9q	<i>CIZ1</i>	AD
	DYT 24	Distonía craneocervical autosómica dominante	11p	<i>ANO3</i>	AD
	DYT 25	Distonía focal primaria autosómica dominante de inicio tardío	18p	<i>GNAL</i>	AD
	<b>Distonías combinadas</b>				
-Distonías persistentes					
1. Distonías con parkinsonismo a. Sin evidencia de degeneración	DYT 5	Distonía con repuesta a levodopa o distonía de Segawa	14q/ 1 p/2 p	<i>GCHI, TH y SPR</i>	AD y AR
	DYT 12	Distonía con parkinsonismo de inicio rápido	19q	<i>ATPIA3</i>	AD
	DYT 16	Distonía con parkinsonismo de inicio en la adolescencia	2p	<i>PRKRA o DYT 16</i>	AR
b. Con evidencia de degeneración	DYT 3	Distonía Parkinsonismo ligado al X o Lubag	Xq	<i>TAF1 o DYT3</i>	Ligada al X
2. Distonías con mioclonus	DYT 11	Distonía mioclónica	7q	<i>SGCE</i>	AD
	DYT 15	Distonía mioclónica	18p	-	AD
	DYT 26	Distonía mioclónica sin respuesta al alcohol	22q	<i>KCTD17</i>	AD
3. Distonías con corea	DYT 4	Distonía con disfonía en susurro	19p	<i>TUBB4A</i>	AD
4. Otras	DYT 29	Distonía de inicio en la infancia con atrofia óptica y anomalía gangliobasales	1p35 3	<i>MECR</i>	AR
<b>Distonías paroxísticas</b>					
-Disquinesias paroxísticas					
	DYT 8	Disquinesia paroxística no quinesiogénica 1	2q	<i>MR-1</i>	AD
	DYT 20	Disquinesia paroxística no quinesiogénica 2	16pq	-	AD
	DYT 10	Disquinesia paroxística quinesiogénica 1	16q	<i>PRRT2</i>	AD
	DYT 19	Disquinesia paroxística quinesiogénica 2	1p	-	AD
	DYT 18			<i>SLC2A1 o GLUT1</i>	AD

AD, autosómico dominante; AR, autosómico recesivo.



## e. Distonías combinadas con parkinsonismo

Las distonías comparten un gran número de superposiciones fisiopatológicas con la enfermedad de Parkinson (EP), siendo ésta observable en el 30% de pacientes con EP y en ocasiones precediendo a las manifestaciones parkinsonianas. Las mutaciones en diversos genes *DYT* como *DYT/PARK-TAF1* (DYT3), *DYT/PARK-ATP1A3* (DYT12), *DYT/PARK-PRKRA* (DYT16), incluyendo los involucrados en la síntesis de dopamina *DYT/PARK-GCHI*(DYT5a), *DYT/PARK-TH*(DYT5b) se han observado comúnmente en pacientes con parkinsonismo (Shetty et al, 2019).

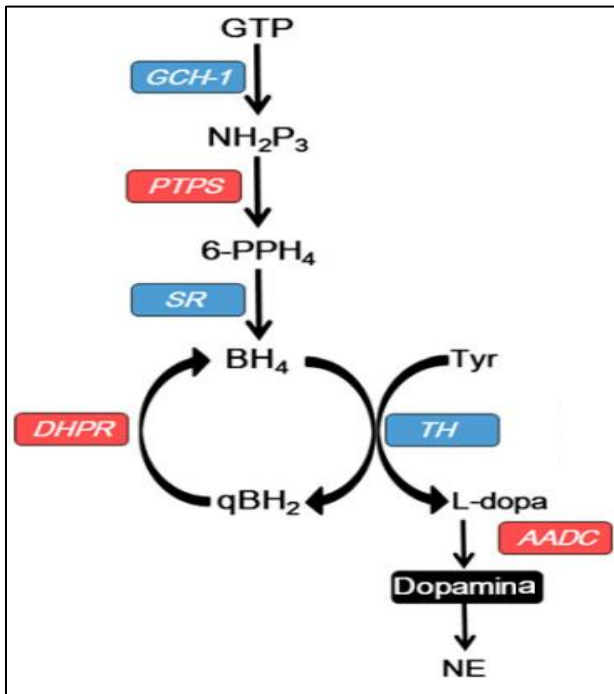
Las distonías combinadas con parkinsonismo denominadas DYT5a y DYT5b se manifiestan desde la niñez y se caracterizan por distonía principalmente en las extremidades inferiores con dificultad para caminar, que pueden progresar a distonía generalizada, fluctuación diurna de los síntomas, manifestación de características parkinsonianas en etapas tardías de la enfermedad y una excelente respuesta a la terapia con L-dopa. Esta última característica permite denominarlas como Distonías Respondedoras a Dopamina (DRD) (Cai et al. 2013; Klein, 2014; Wijemanne & Jankovic, 2015). Las características clínicas de DYT5a y DYT5b se describían como dos formas del Síndrome de Segawa, aunque actualmente, se sabe que esa denominación solo corresponde a la forma autosómica recesiva ligada al gen de la tirosina hidroxilasa (*TH*) (OMIM#605407).

La dopamina, la noradrenalina y la serotonina son transmisores de monoaminas que juegan un papel crucial en el control motor, el sueño, las emociones y en las funciones cognitivas y autónomas, las deficiencias de las enzimas encargadas de la biosíntesis de la dopamina producirán un fenotipo de DRD (Randby et al. 2018).

DYT5a es la DRD más frecuente, se hereda de manera autosómica dominante y es causada por mutaciones en el gen de la guanosina trifosfato (GTP) ciclohidrolasa 1 (*GCHI*), aunque en menor medida también se hereda de forma autosómica recesiva en condiciones de mutaciones heterocigotas compuestas (Klein, 2014; Wijemanne & Jankovic, 2015); la DRD menos frecuente (DYT5b) se hereda de manera autosómica recesiva y se asocia con mutaciones *TH* (Klein, 2014).

El término de DRD también se utiliza para denominar a distonías causadas por la deficiencia de otras enzimas que están involucradas en la síntesis de la dopamina como la 6-piruvoil tetrahidropterina sintasa (PTPS) y la sepiapterina reductasa (SPR). En la Fig. 1 se presenta la ruta biológica y todas las enzimas que participan en la síntesis de la dopamina mostrando la gran importancia de la GTP ciclohidrolasa 1 y la tirosina hidroxilasa (Wijemanne & Jankovic, 2015; Randby et al. 2018).

Es importante destacar que las mutaciones en *TH* causan un fenotipo clínico similar pero mucho más grave que el causado por mutaciones homocigotas de *GCHI* (Klein, 2014).



**Fig. 1.** Ruta biológica para la síntesis de dopamina. Las enzimas en las que los defectos pueden causar distonía sensible a la dopa (DRD) y DRD-plus se muestran en azul, y las enzimas en las que los defectos solo pueden causar DRD-plus se muestran en rojo. GTP, guanosina trifosfato; GCH-1, GTP ciclohidrolasa 1;  $\text{NH}_2\text{P}_3$ , dihidroneopterina trifosfato; PTPS, 6-piruvoiltetrahydropterina sintasa; 6-PPH<sub>4</sub>, 6-piruvoil-tetrahydropterina; SR, sepiapterina reductasa; BH<sub>4</sub>, tetrahydrobiopterina; Tyr, tirosina; DHPR, dihydropteridina reductasa; TH, tirosina hidroxilasa; qBH<sub>2</sub>, dihydrobiopterina quinonoide; Ldopa, L-dihydroxifenilalanina; AADC, L-aminoácido aromático descarboxilasa; NE, noradrenalina. (Extraída de Kim et al. 2016).

## f. Genética de las distonías respondedoras a dopamina (DRD)

El gen *GCHI* codifica para la enzima GTP ciclohidrolasa, se conforma de 6 exones y se localiza en 14q22.1-q22.2 (localización física Chr14: 55,308,723 - 55,369,542) con una longitud de 60.82 kb (*GCHI*, OMIM#600225).

La GTP ciclohidrolasa es la enzima limitante de la velocidad en la biosíntesis de tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) al catalizar el primer paso de dicha ruta, el BH<sub>4</sub> es un cofactor esencial para función de la tirosina hidroxilasa (*TH*), triptófano hidroxilasa (*TPH*) y fenilalanina hidroxilasa (*HAP*) (Furukawa, 2019) (Fig. 1).

El gen *GCHI* tiene 3 transcritos alternativos con diferentes extremos 3', como resultado de empalmes alternativos, aunque solo el tipo 1 posee la codificación más larga dando lugar a la producción de la enzima activa de 250 aminoácidos (Furukawa, 2019).

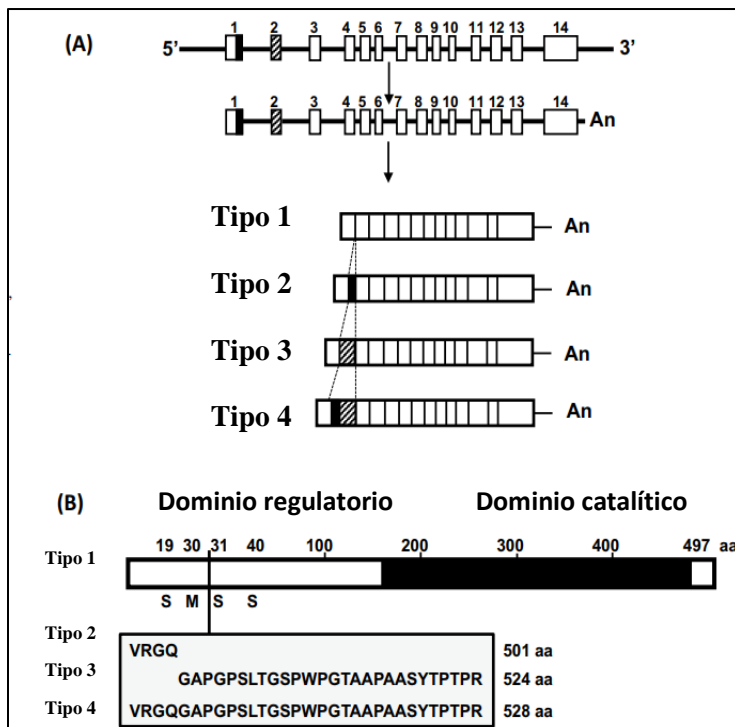
Hasta la fecha, se han informado 260 mutaciones diferentes en *GCHI* (HGMD, 2020), distribuidas a lo largo de todo el gen, incluyendo variantes de sentido erróneo (o cambio de sentido), sin sentido y de alteración en el empalme, deleciones pequeñas y grandes (de uno o varios exones o de todo el gen completo), y mutaciones en regiones no traducidas (Klein, 2014).

La deficiencia de la función de la GTP ciclohidrolasa se asocia a variantes genéticas patogénicas, reduciendo la biosíntesis de BH4 y por consecuencia se reduce la síntesis de monoaminas en el cerebro. Aunque, anteriormente se consideraba que las variantes patogénicas en este gen se asociaban con hiperfenilalaninemia, se ha dilucidado que este síntoma es resultado de mutaciones heterocigotas compuestas de *GCHI* (con patrón autosómico recesivo), pero para mutaciones autosómicas dominantes de *GCHI* se afecta selectivamente al cerebro y no al hígado y rara vez se desarrollan síntomas relacionados con una deficiencia de serotonina (Wijemanne & Jankovic, 2015; Furukawa, 2019).

El gen *TH* codifica para la enzima tirosina hidroxilasa (también llamada tirosina 3-monooxigenasa), se conforma de 14 exones y se localiza en 11p15.5 (localización física Chr11: 2.185.159 - 2.193.035) con una longitud de 7.88 kb (OMIM#191290).

La tirosina hidroxilasa es la enzima limitante y primer paso en la síntesis de catecolaminas (dopamina, adrenalina y noradrenalina), es una monooxigenasa que contiene hierro, que requiere BH4 como cofactor, cataliza la conversión de L-tirosina a L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) a través de la inserción de un átomo de oxígeno molecular en el anillo aromático de la tirosina (Fig.1) (Nagatsu et al. 2018, Szigetvari et al 2019).

El empalme alternativo de *TH* genera 4 isoformas de tirosina hidroxilasa (hTH1-4) en el sistema nervioso central (Fig. 2), las más abundantes son hTH1 and hTH2, y aunque, estas variantes cumplen funciones reguladoras diferentes, presentan diferencias menores en la función catalítica de la enzima (Nagatsu et al. 2018, Szigetvari et al 2019).



**Fig. 2. (A)** Estructuras de la tirosina hidroxilasa y su transcripción primaria. El empalme alternativo produce los cuatro tipos de ARNm (hTH1-4) a partir de un solo gen. **(B)** Diagrama esquemático de la estructura hTH4, que indica el dominio regulatorio N-terminal con los sitios principales de fosforilación (Serina 19,31 y 40), el dominio catalítico central y el dominio de unión entre subunidades C-terminal. La nomenclatura de la mutación se basa en hTH4, transcrito de longitud completa con 528 aminoácidos. An, cola de poli A; aa, aminoácidos. (Extraído de Nagatsu et al. 2018)



Se han descrito 79 mutaciones en *TH* (HGMD 2020), y aunque la mayoría de ellas son de sentido erróneo o sin sentido, también se han documentado grandes deleciones del gen, generando una deficiencia de catecolaminas a nivel cerebral (Szigetvari et al 2019).

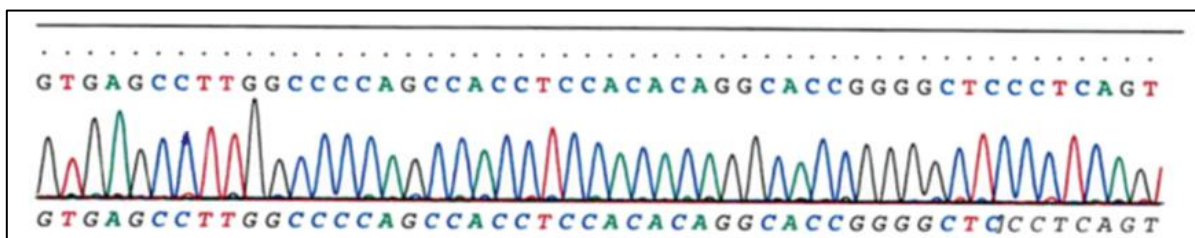
### g. Secuenciación tipo Sanger

La secuenciación tipo Sanger es un método de secuenciación dirigida, utilizada para determinar la secuencia de una molécula de DNA, utiliza un cebador de DNA diseñado para ser un punto de partida para la síntesis de DNA en la cadena a secuenciar.

La técnica comienza con una desnaturalización del DNA bicatenario, los cebadores se alinean en cada hebra y se elonga la secuencia del cebador utilizando la hebra como molde, en la elongación se utiliza una mezcla de desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) para la elongación de la cadena y una pequeña cantidad de didesoxinucleósidos trifosfato (ddNTPs) (Gomes & Korf, 2018). Cuando se incorpora un ddNTP en una cadena de nucleótidos, la síntesis termina, esto se debe a que la molécula ddNTP carece de un grupo hidroxilo 3', que se requiere para formar un enlace con el siguiente nucleótido en la cadena. Debido al uso de didesoxinucleósidos en las reacciones, la secuenciación de Sanger también se denomina secuenciación "didesoxi" (Gomes & Korf, 2018).

Cada ddNTP incluye un marcador fluorescente diferente (con diferente espectro de emisión: A con verde, T con rojo, G con negro y C con azul) que emitirá fluorescencia cuando se une un ddNTP a la secuencia de alargamiento, los ddNTP son incorporados a la cadena en posiciones al azar, terminando la síntesis de la cadena y generando diversas longitudes, un láser excita al fluorocromo y una cámara CCD, dentro de un analizador genético detecta una intensidad fluorescente que se traduce en un "pico" (Fig. 3) (Gomes & Korf, 2018).

Cuando se produce una variante heterocigótica dentro de una secuencia, los dos alelos serán capturados por los dos marcadores fluorescentes que mostrarán un pico sobrelapado. Cuando está presente una variante homocigota, el color fluorescente esperado se reemplaza completamente por el color del nuevo par de bases (Gomes & Korf, 2018).



**Fig. 3.** Ejemplo de un electroferograma obtenido por secuenciación tipo Sanger en el que se aprecian los picos cada ddNTP (dirección 5'-3').

## 9. METODOLOGÍA

### a. Sujetos de estudio

Este proyecto de carácter observacional de corte transversal es parte del proyecto titulado “Evaluación clínica y molecular de pacientes con distonía DYT1, DYT5a, DYT5b, DYT6, DYT12 y DYT16” del Departamento de Genética del INNNMVS y del proyecto de investigación “Estudio farmacogenómico en población mexicana normal y en pacientes con enfermedades neurológicas” del Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM- Xochimilco.

El protocolo fue aprobado por los Comités de Investigación y de Bioética del INNNMVS (protocolo 155/18) y siguiendo los requerimientos éticos internacionales, se incluyeron en el estudio 19 pacientes (Px) mestizos mexicanos de ambos sexos con diagnóstico clínico de distonías respondedoras a dopamina, síndrome de Segawa o distonía combinada con parkinsonismo (Tabla 2), que acudieron a consulta a la Clínica de movimientos anormales del INNNMVS y que fueron referidos al Departamento de Genética para su evaluación. Previa explicación del protocolo y firma de carta de consentimiento informado (Anexo 1), los 19 pacientes aceptaron participar voluntariamente en este estudio y se tomó muestra de sangre periférica a cada uno.

**Tabla 2.** Pacientes con DYT participantes en el estudio (n=19).

Género	Número de Px	Rango de edad (años)
Femenino	12	12 a 59
Masculino	7	17 a 52

Px: pacientes.

Cada muestra se designó con un código alfanumérico para asegurar su anonimato. De acuerdo a la sospecha clínica de los neurólogos y el médico genetista, se consultó la base de datos del INNNMVS y se designaron los genes por analizar para cada muestra (Tabla 3).

**Tabla 3.** Relación de muestras y genes por analizar

Código de muestra	Análisis del gen <i>GCHI</i>	Análisis del gen <i>TH</i>
DYT 16	(-)	(+)
DYT 53	(-)	(+)
DYT 54	(-)	(+)
DYT 56	(-)	(+)
DYT 59	(+)	(+)
DYT 61	(+)	(+)

DYT 65	(+)	(+)
DYT 71	(-)	(+)
DYT 75	(+)	(+)
DYT 77	(+)	(+)
DYT 79	(+)	(+)
DYT 98	(-)	(+)
DYT 100	(+)	(+)
DYT 105	(+)	(+)
DYT 109	(+)	(+)
PK 628	(+)	(+)
PK 1127	(-)	(+)
PK 1137	(+)	(+)
PK 1194	(+)	(+)

(+), gen candidato para análisis; (-), gen descartado para análisis.

## b. Extracción de DNA genómico

En un lapso no mayor a 3 horas después de la obtención de la muestra sanguínea, se realizó lo siguiente: Se separó 1mL de plasma y se preservó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. De 3 mL de muestra sanguínea se separaron las células mononucleares (CMN), se dividieron en 2 tubos y se les agregó *RNA later* (AMBION) como estabilizador para preservar las células. Las CMN se congelaron inmediatamente a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Del remanente de sangre se extrajo DNA genómico por método salino, se tomaron de 1 a 5 alícuotas de trabajo de concentración desconocida y el resto se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Se realizó el análisis cualitativo y cuantitativo de cada alícuota de DNA por medio de electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría en un equipo *Thermo Scientific NanoDrop 2000*<sup>TM</sup>, respectivamente. La cuantificación se realizó con 2  $\mu\text{L}$  de agua libre de DNasas como blanco y 2  $\mu\text{L}$  de cada alícuota de DNA, realizando la lectura de cada muestra por triplicado.

Los criterios de aceptación de pureza fueron 1.8 a 2.0 en la relación 260/280 y 2.0 a 2.2 para la relación 260/230 indicado en la literatura (Chacon-Cortes & Griffiths, 2014), para discriminar contaminación por proteínas y carbohidratos, respectivamente.

Se realizó la determinación de integridad (calidad) por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% en amortiguador SB (1X) (Anexo 2) a 80 Volts por 45 minutos, se utilizó el marcador de peso molecular de la marca *Fermentas*<sup>TM</sup> *GeneRuler DNA Ladder, Low Range*, el amortiguador de carga *Thermo Scientific*<sup>TM</sup> *6X TriTrack DNA Loading Dye* y bromuro de etidio (250ng/mL) como agente intercalante para visualizar el gel a la luz ultravioleta.



Se realizaron alícuotas de trabajo a una concentración de 50 ng/μL de DNA para cada muestra. En este trabajo se incluyeron aquellas muestras que cumplieran con los criterios de pureza e integridad mencionados.

### c. Amplificación de genes *GCH1* y *TH* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Por medio de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificaron la región promotora, los 6 exones de *GCH1* y los 14 exones de *TH* en las muestras indicadas.

Las PCR se llevaron a cabo utilizando 0.5 μL de cada alícuota de DNA (50 ng/μL), 11 μL de mezcla comercial de la marca *KAPA2G™ Fast HotStart Ready Mix*, 0.5 μL de cada oligonucleótido (marca *T4 Oligo®*) cuyas secuencias se presenta en las Tablas 4 y 5 y agua libre de DNAsas necesaria para llevar a un volumen de 20 μL.

**Tabla 4.** Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en las PCR de *GCH1*.

Región a amplificar	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	TM (°C)
Región promotora	GCH1_P280_F	CCCGCACAGGGCCCTTCT	64.44
	GCH1_P280_R	AGGGCCGTGACGCGAGG	64.65
	GCH1_P250_F	CGGAGCGCTCCCATTGG	60.58
	GCH1_P250_R	GACCGCGTCTTTCTCACTGA	60.04
	GCH1_P221_F	GGACCCCTCCACTTATTG	53.86
	GCH1_P221_R	GGTTCCTAATCGGTGGCT	56.29
	GCH1_P218_F	GTGGCCTTGCTGGAGAG	60.05
	GCH1_P218_R	CTAGCAACCATAAATCCTATCC	53.84
Exón 1	GCH1_E1.4_F	GTCCTTCCCGAACGGCAG	60.43
	GCH1_E1.4_R	CTGCGCGCTCTTGGCCT	63.26
	GCH1_E1.5_F	AGGTGCAGCAATGGGTTC	57.90
Exón 2	GCH1_E1.5_R	GAGCTCAGGATGGACGAGT	58.50
	GCH1_E2_F	CCTCCGTTCTCCTTCCTCTT	58.44
Exón 3	GCH1_E2_R	GGCTTATCCTGAGAGCCTTC	57.46
	GCH1_E3_F	AACAGTTCAGATGTTTTCAAGG	57.48
Exón 4	GCH1_E3_R	GTAGGGGACGAGAAGGAAGG	58.89
	GCH1_E4_F	GTCCTTTTTGTTTTATGAGGAAGGC	59.07
Exón 5	GCH1_E4_R	GGTGATGCACTCTTATAATCTCAGC	59.59
	GCH1_E5_F	AGCTGGTGTGTCTTGGCTCT	61.41
Exón 6	GCH1_E5_R	AGGCTCAGGGATGGAAATCT	58.10
	GCH1_E6_F	ACCAAACCAGCAGCTGTCTACTCC	64.65

Terminación “F” para oligonucleótido sentido y terminación “R” para oligonucleótido reverso.  
TM, temperatura de alineamiento.

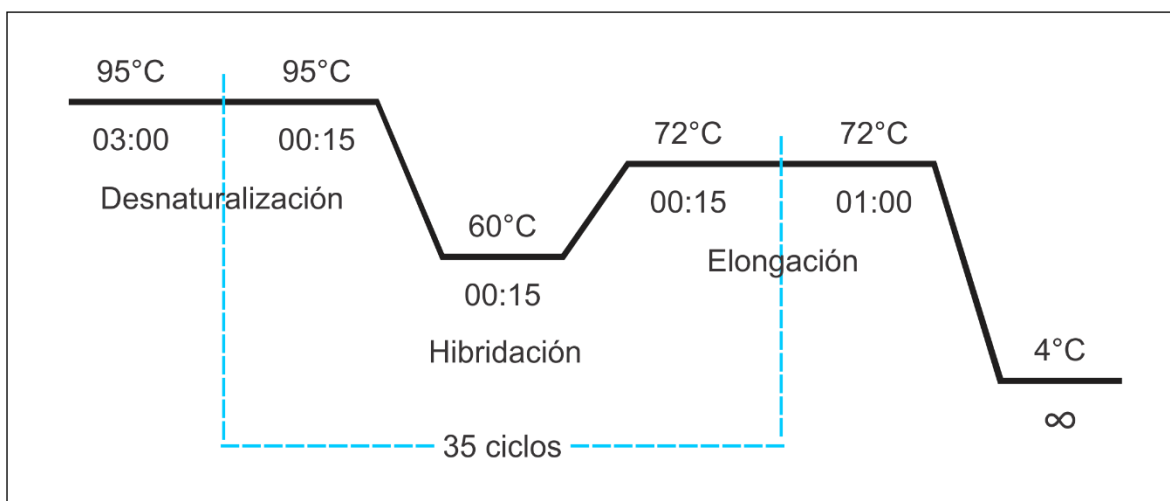
**Tabla 5.** Oligonucleótidos utilizados en las PCR de *TH*.

Región a amplificar	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	TM (°C)
Exón 1	TH_E1_F	GGATGTAAGGAGGGGAAGGT	58.11
	TH_E1_R	CCCAACAGGGACTCAAACAC	58.68
Exón 2	TH_E2_F	CATTTCCAGGTACCTTCTCAGG	58.12
	TH_E2_R	AGGGTTGTGGAACATGAAGG	57.71
Exón 3	TH_E3_F	CTCTCATCCCCTGCCTCTGT	60.69
	TH_E3_R	CACCCACAGGTGAACTTGC	58.97
Exón 4	TH_E4_F	AAGAACGGGATCTGTGTGCT	59.31
	TH_E4_R	ACCCACAGCCTCTCAAGGT	59.79
Exones 5 y 6	TH_E5-E6_F	GTAGGGGAGGCTGCTTCAA	59.01
	TH_E5-E6_R	CTGGTGACAAGATGGGTCTCT	59.01
Exón 7	TH_E7_F	CACCCTCCTGTCCATCCTC	58.78
	TH_E7_R	CCTCACACGCCAGGATTC	57.79
Exones 8, 9 y 10	TH_E8-E9-E10_F	AAGAGGCCTGCGTTGGTAG	59.70
	TH_E8-E9-E10_R	AGCAGGCAGCACACTTCAC	60.90
Exones 11 y 12	TH_E11-E12_F	AGGGAAGTGTCCCAGAGACC	60.55
	TH_E11-E12_R	GTCCAGGCCTCAGTTTCCTC	60.04
Exón 13	TH_E13_F	GGGTGACTCTACCCAAGGAA	58.35
	TH_E13_R	AGGGGTCGGTTTTCTCATCT	58.34
Exón 14	TH_E14_F	TCTGAGCCACTGTGAAGGTG	59.61
	TH_E14-R	GAGGATCCCAGGGTCTGTCT	60.03

Terminación “F” para oligonucleótido sentido y terminación “R” para oligonucleótido reverso.  
TM, temperatura de alineamiento.

Se realizó la estandarización de PCR para cada par de oligonucleótidos por medio de 4 reacciones denominadas blanco, control, muestra 1 y muestra 2, se utilizaron las cantidades de reactivos antes mencionados, solo variando la muestra de DNA; en la reacción blanco se sustituyó el DNA por agua libre de nucleasas, en la reacción control se utilizó DNA de un individuo sano, para la muestra 1 y muestra 2 se seleccionaron DNA de pacientes, DYT100 y PK1137.

Las reacciones de PCR se realizaron en un equipo termociclador *GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)*, utilizando el programa mostrado en la Fig. 4, variando solo la temperatura de hibridación para adecuarla a cada par de oligonucleótidos.



**Fig. 4.** Programa de PCR donde se indican el tiempo en minutos y segundos (mm:ss) y temperatura.

Las longitudes en pares de bases (pb) de cada amplicón esperado se obtuvieron con la herramienta *Primer-BLAST* (NCBI), las cuales se presentan en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Longitudes esperadas para cada amplicón de *GCHI* y *TH*.

<i>GCHI</i>		<i>TH</i>	
Región	Longitud en pb	Región	Longitud en pb
Promotor P218	218	Exón 1	397
Promotor P221	221	Exón 2	245
Promotor P250	252	Exón 3	385
Promotor P280	280	Exón 4	378
Exón 1 1.4	178	Exones 5 y 6	500
Exón 1 1.5	194	Exón 7	260
Exón 2	583	Exones 8, 9 y 10	767
Exón 3	379	Exones 11 y 12	602
Exón 4	288	Exón 13	363
Exón 5	352	Exón 14	619
Exón 6	233	-	-

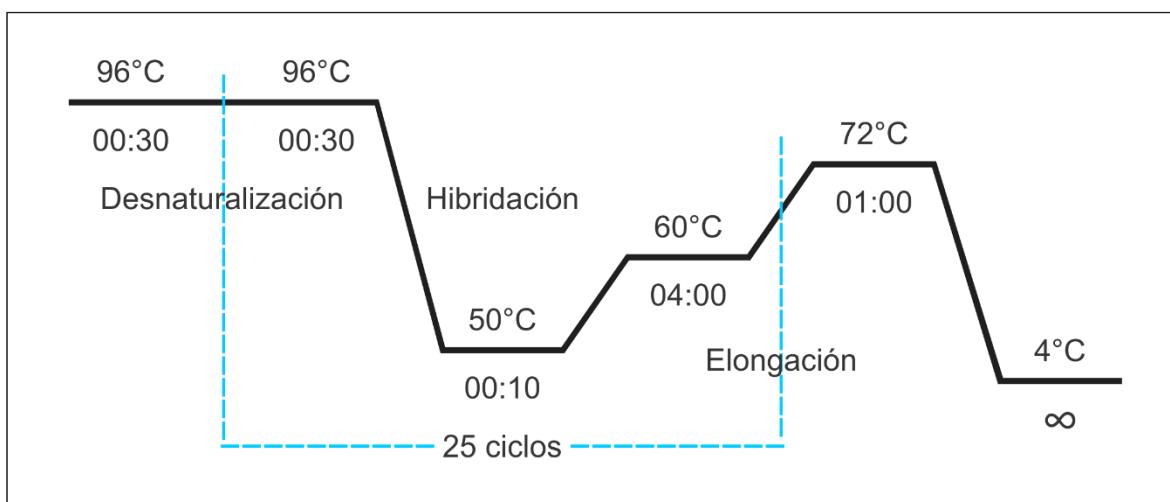
pb, pares de bases.

La presencia de los amplicones se determinó por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% en amortiguador SB (1X) a 80 Volts por 45 minutos, se utilizó el marcador de peso molecular de la marca *Fermentas™ GeneRuler DNA Ladder, Low Range*, el amortiguador de carga *Thermo Scientific™ 6X TriTrack DNA Loading Dye* y bromuro de etidio (250ng/mL) como agente intercalante para visualizar el gel a la luz ultravioleta.



#### d. Secuenciación de los amplicones

Se realizó la secuenciación de los amplicones por método de Sanger utilizando 2  $\mu\text{L}$  del reactivo *BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix*, 2  $\mu\text{L}$  de amortiguador *BigDye™ Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer*, 1  $\mu\text{L}$  de oligonucleótido sentido, producto de PCR equivalente a 10 ng de amplicón y agua libre de DNAsas (c.b.p. 10  $\mu\text{L}$ ); las reacciones de secuenciación se realizaron en un equipo termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems*), utilizando el programa mostrado en la Fig. 5.



**Fig. 5.** Programa universal para la reacción de secuenciación donde se indican el tiempo en minutos y segundos (mm:ss) y temperatura.

Las secuencias obtenidas se purificaron en columnas comerciales de sefarosa de poro medio, *DNA Sequencing Clean-Up Kit™* (*ZYMO RESEARCH*) y se secaron por centrifugación al vacío en un equipo *Eppendorf Concentrator 530*. Posteriormente se rehidrataron con 10  $\mu\text{L}$  de formamida en una placa de 96 pozos y se desnaturalizaron a 95°C por 5 minutos, seguido de un descenso a 4°C y manteniendo la reacción en hielo.

Por último, se analizaron las secuencias por electroforesis capilar en un analizador genético AB3130 de *Applied Biosystems®* obteniendo los electroferogramas en archivos \*.ab1 para su posterior análisis.

## e. Análisis de secuencias

Las secuencias se analizaron con los programas informáticos *Mutation Surveyor*® (*SoftGenetics*), *Sequencher*® (*Genecodes*) y *GeneStudio*™, utilizando como referencia las secuencias de los genes y mensajeros de *TH* (NG\_008128.1, NM\_000360.4) y *GCHI* (NG\_008647.1, NM\_000161.3) de la base de datos *Gene* de *NCBI* en un archivo *GeneBank*. Las variantes genéticas identificadas se compararon con las reportadas en bases de datos públicas como *Ensembl* y *NCBI*. La predicción *in silico* de las variantes no sinónimas se realizó con *PolyPhen-2* y *Mutation Taster*.

## 10. ACTIVIDADES REALIZADAS

---

- Se extrajo el DNA genómico de muestras de sangre total de algunos pacientes.
- Se determinó la pureza de las muestras de DNA genómico.
- Se realizó la cuantificación de DNA genómico.
- Se determinó la integridad del DNA genómico de los pacientes por medio de una electroforesis en geles de agarosa al 2%.
- Se realizaron alícuotas de trabajo de las muestras de DNA genómico que cumplieron con los criterios de concentración, pureza e integridad.
- Se hidrataron los oligonucleótidos para la obtención de un stock y posteriormente se prepararon alícuotas de trabajo.
- Se estandarizaron las condiciones de temperatura y cantidad de reactivos para cada ensayo de PCR.
- Se amplificaron los exones de TH por la técnica de PCR.
- Se determinó la presencia de los amplicones de interés por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2%.
- Se realizó la reacción de secuenciación para cada amplicon de interés.
- Se utilizó un analizador genético para la obtención de la secuencia genética de cada amplicon.
- Se analizaron las secuencias genéticas por medio de software especializado.

## 11. RESULTADOS

### f. Selección de DNA genómico para el análisis de GCH1 y TH

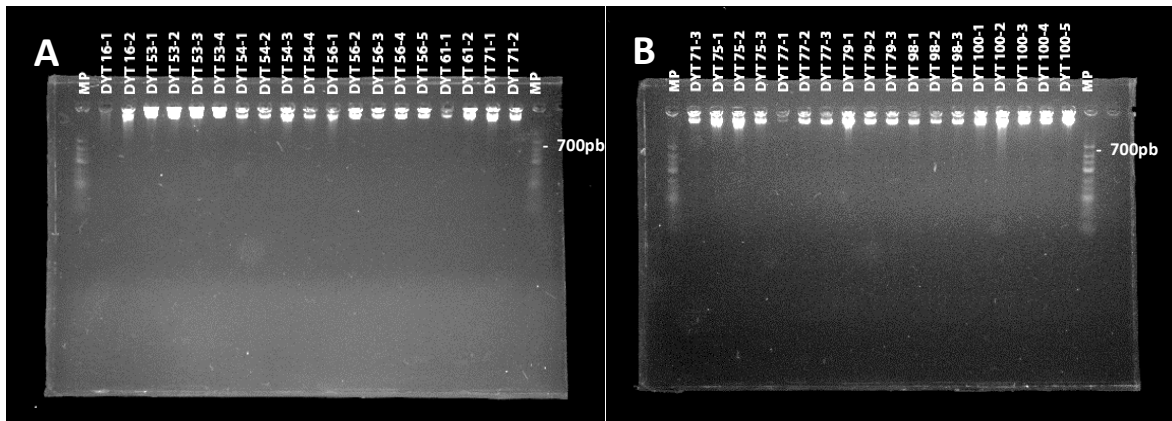
Las muestras seleccionadas para el análisis de *GCH1* y *TH* cumplen con los criterios de pureza por proteínas (relación 260/280) y por carbohidratos (relación 260/230) permitiendo realizar alícuotas de trabajo con una concentración de DNA de 50 ng/μL (Tabla 8).

**Tabla 8.** Datos representativos de concentración y relaciones 260/280 y 260/230 de las muestras de DNA con código DYT100 y PK1137 (las lecturas se realizaron por triplicado).

Código	Concentración (ng/μL)	Relación 260/280	Relación 260/230
DYT 100-1	233.9	1.85	2.13
DYT 100-1	241.0	1.84	2.11
DYT 100-1	238.5	1.85	2.12
DYT 100-2	174.4	1.85	2.11
DYT 100-2	175.9	1.84	2.07
DYT 100-2	173.0	1.85	2.11
DYT 100-3	247.6	1.84	2.17
DYT 100-3	245.7	1.84	2.15
DYT 100-3	248.1	1.84	2.16
DYT 100-4	222.3	1.84	2.08
DYT 100-4	230.7	1.85	2.13
DYT 100-4	237.8	1.85	2.12
DYT 100-5	225.4	1.85	2.18
DYT 100-5	227.6	1.86	2.19
DYT 100-5	226.9	1.86	2.21
PK 1137-1	282.2	1.86	2.23
PK 1137-1	286.1	1.85	2.25
PK 1137-1	282.6	1.85	2.23
PK 1137-2	419.4	1.85	2.24
PK 1137-2	412.8	1.86	2.23
PK 1137-2	401.8	1.85	2.23
PK 1137-3	163.6	1.86	2.10
PK 1137-3	167.7	1.84	2.17
PK 1137-3	166.5	1.84	2.22

La electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% (Fig. 6) demostró que las alícuotas presentaron una adecuada integridad del DNA al no observarse ningún barrido y su alto peso molecular al concentrar la fluorescencia muy alejado de la referencia de 700 pares de bases (pb) del marcador de peso molecular comercial.





**Figura 6.** Imagen representativa para evaluar calidad del DNA. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de las alícuotas de DNA (A y B) donde se observa la integridad y el alto peso molecular comparado con 700 pb. MP, marcador de peso molecular; pb, pares de bases.

### g. Estandarización de PCR

Los ensayos de estandarización permitieron establecer las cantidades adecuadas de cada reactivo para obtener el mejor rendimiento de la PCR, en algunos casos se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) como co-solvente para promover la amplificación de la secuencia de interés y evitar productos inespecíficos. En las tablas 9 y 10 se muestran los volúmenes que presentaron un adecuado rendimiento para *GHC1* y *TH*, respectivamente.

**Tabla 9.** Temperatura de hibridación y cantidades finales de reactivos en la estandarización de PCR para la región promotora y los exones de *GCHI*.

Condiciones y reactivos	Promotor				Exones						
	P218	P221	P252	P280	1.4	1.5	2	3	4	5	6
Temperatura de hibridación (°C)	60			64	60			62	64		
Muestra (µL)	0.5										
Oligonucleótido sentido 10µM (µL)	0.5										
Oligonucleótido reverso 10µM (µL)	0.5										
Mezcla comercial de PCR (µL)	11										

DMSO ( $\mu\text{L}$ )	-	1.0	-
Agua	c.b.p.		
Total ( $\mu\text{L}$ )	20		

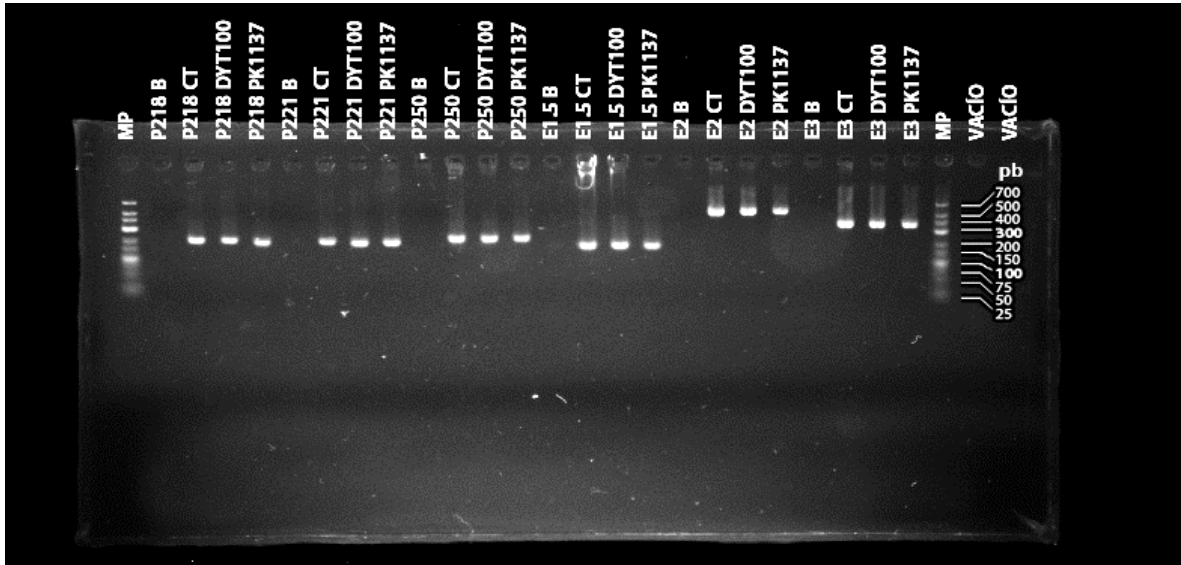
DMSO: dimetilsulfóxido.

**Tabla 10.** Temperatura de hibridación y cantidades finales de reactivos en la estandarización de PCR para los exones de *TH*.

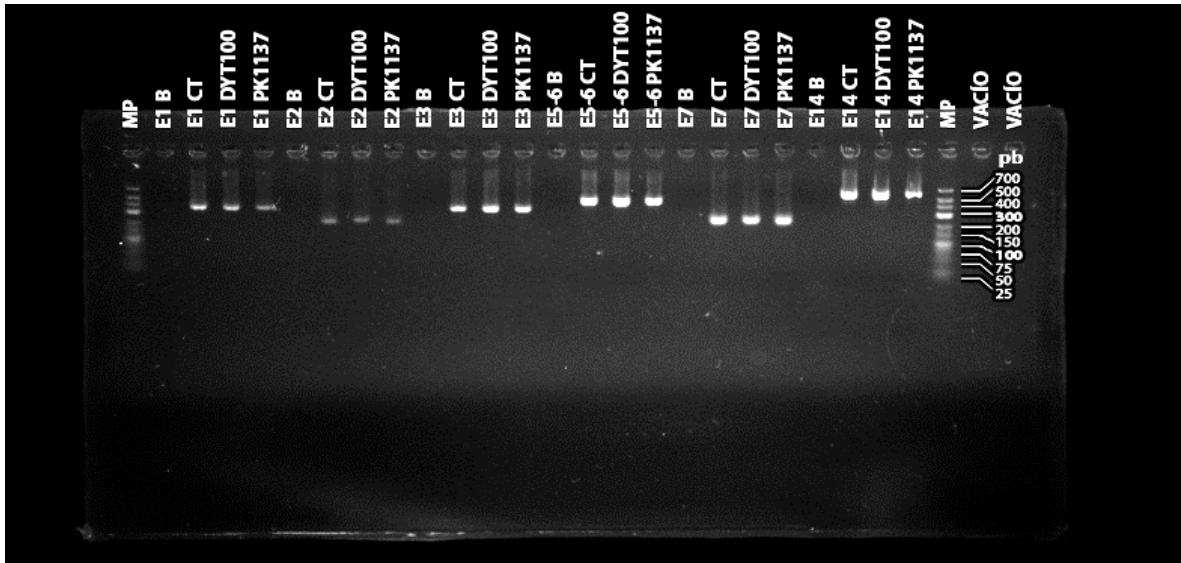
Condiciones y reactivos	Exones										
	1	2	3	4	5 y 6	7	8, 9 y 10	11 y 12	13	14	
Temperatura de Hibridación ( $^{\circ}\text{C}$ )	60					62				60	
Muestra ( $\mu\text{L}$ )	0.5										
Oligonucleótido sentido $10\mu\text{M}$ ( $\mu\text{L}$ )	0.35		0.5	0.35		0.5			0.35		
Oligonucleótido reverso $10\mu\text{M}$ ( $\mu\text{L}$ )	0.35		0.5	0.35		0.5			0.35		
Mezcla comercial de PCR ( $\mu\text{L}$ )	11										
DMSO ( $\mu\text{L}$ )	-	1.0	-								
Agua	c.b.p.										
Total ( $\mu\text{L}$ )	20										

DMSO: dimetilsulfóxido.

La electroforesis de las reacciones de PCR permitió identificar la presencia de cada amplicón de interés al compararlos con un marcador de peso molecular, los pesos en pares de bases (pb) fueron los esperados a los mostrados anteriormente en la tabla 6, en las Fig. 7 y 8 se muestran las electroforesis para amplicones de *GCHI* y *TH* respectivamente.



**Fig. 7.** Fotografía posterior a la electroforesis donde se aprecian los amplicones obtenidos de las PCR de algunos exones y región promotora de *GCHI* para una muestra control y las muestras DYT100 y PK1137. MP, marcador de peso molecular; P, región promotora; E, exón, B, Blanco; CT, control; pb, pares de bases.



**Fig. 8.** Fotografía posterior a la electroforesis donde se aprecian los amplicones obtenidos de las PCR de algunos exones de *TH* para una muestra control y las muestras DYT100 y PK1137. MP, marcador de peso molecular; P, región promotora; E, exón, B, Blanco; CT, control; pb, pares de bases.

## h. Secuenciación tipo Sanger

Se estandarizaron las condiciones de PCR para ambos genes y solamente se presentan los resultados de secuenciación de *TH*.

Las variantes genéticas identificadas en *TH* se muestran en la Tabla 11, para las variantes ya reportadas en bases de datos públicas se muestran los identificadores rs (*reference sequence*), para las variantes no reportadas se muestra la probable implicación clínica por predicción *in silico*.

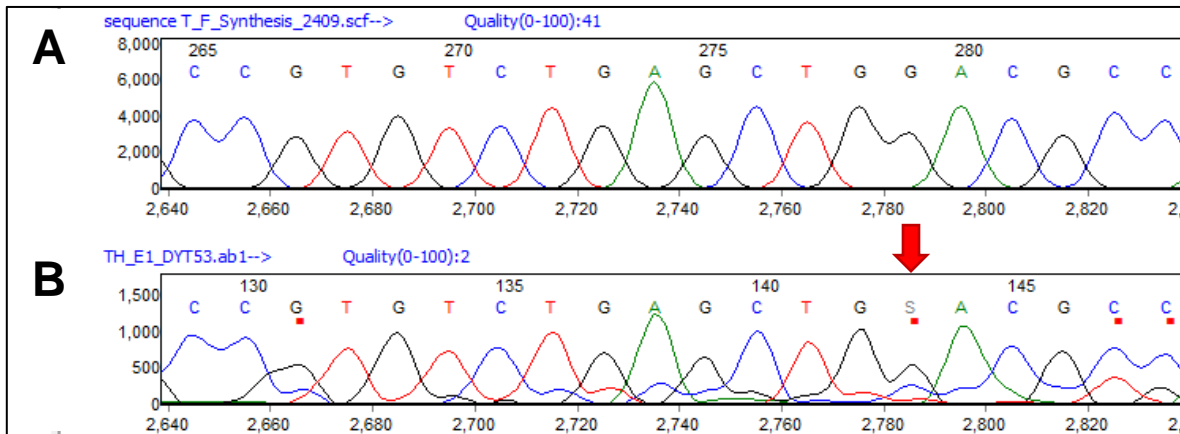
**Tabla 11.** Variantes alélicas identificadas en *TH* (Ordenadas secuencialmente en dirección 5' a 3').

Nomenclatura Variante	Tipo de variante	RS	Frecuencia (%)	Relevancia clínica	Pacientes
c.64G>C (p.Asp22His)	De sentido erróneo	No reportada	5	Pb dañina*	DYT53
g.2171597C>T (c.121+88C>T)	Intrónica	No reportada	5	Sin información	DYT53
g.2171591G>A (c.121+94G>A)	Intrónica	No reportada	5	Sin información	DYT53
g.2169925A>G (c.203-54A>G)	Intrónica	rs7925375	32	Benigna	DYT: 53, 54, 56, 79 PK: 628, 1127
c.334G>A (p.Val112Met)	De sentido erróneo	rs6356	32	Benigna	DYT: 53, 54, 56, 79 PK: 628, 1127
g.2167955C>T (c.689-22C>T)	Intrónica	rs4074905	75	Benigna	DYT: 16, 53, 54, 56, 59, 61,65, 71, 79, 98, 100, 105, 109 PK: 628, 1127, 1137
c.1321C>T (p.Arg441Trp)	De sentido erróneo	rs575326605	5	Pb dañina*	DYT105

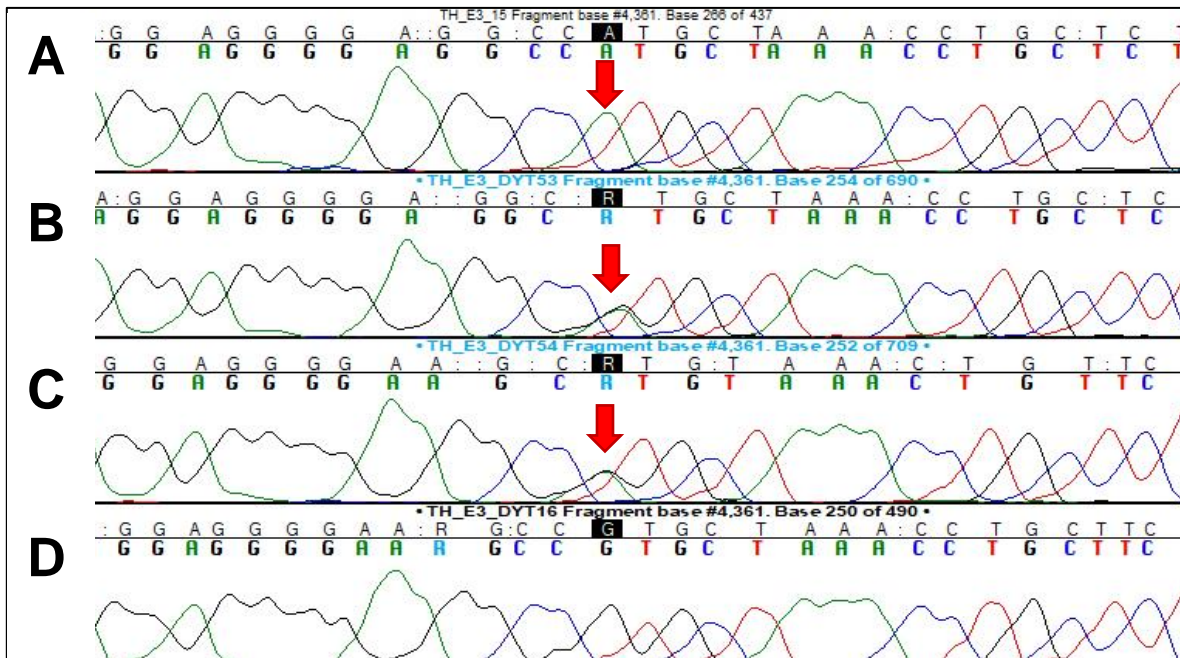
Pb, probablemente. \*, De acuerdo a *PholyPhen-2* y *Mutation Taster*.

Todos los cambios de secuencia identificados corresponden a variantes de un solo nucleótido (antes SNP, ahora SNV). No se identificaron inserciones ni deleciones. En las Fig. 9, 10 y 11 se presentan las secuencias parciales que permiten apreciar las variantes genéticas p.Asp22His, p.Val112Met y p.Arg441Trp, respectivamente.

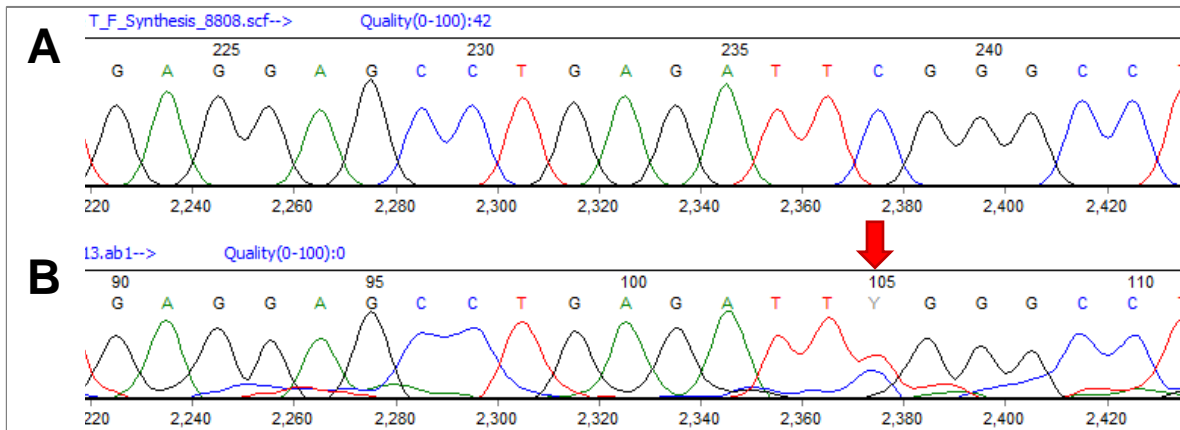




**Fig. 9.** Electroferogramas parciales de la secuencia de referencia (A) y de DYT53 (B), en los que se puede observar la variante c.64G>C; p.Asp22His en estado heterocigoto (indicada con flecha roja) presente en la muestra DYT53.



**Fig. 10.** Electroferogramas parciales de la secuencia de PK628 (A), DYT53 (B), DYT54 (C) y DYT16 (D), en los que se puede observar la presencia de la variante c.334G>A; p.Val112Met en estado homocigoto en PK628 y en estado heterocigoto en DYT53 y DYT54 (indicadas con flechas rojas). La muestra DYT16 presentó genotipo silvestre para esta variante.



**Fig. 11.** Electroferogramas parciales de la secuencia de referencia (A) y de DYT105 (B), en los que se puede observar la variante c.1321C>T; p.Arg441Trp en estado heterocigoto presente en la muestra DYT105 (indicada con flecha roja).

## 12. DISCUSIÓN

La secuenciación de los exones de *TH* evidenció la presencia de dos variantes intrónicas y una de sentido erróneo consideradas como nuevas, debido a que no existe información precedente sobre las mismas en las bases de datos consultadas, se dificulta aseverar su importancia clínica y sus porcentajes de frecuencia en otras poblaciones.

Las variantes nuevas g.2171597C>T y g.2171591G>A son variantes intrónicas encontradas entre los exones 1 y 2 de *TH*, de acuerdo al análisis *in silico* en *Human Splicing Finder*, la posición en la que se encuentran no afecta los sitios de empalme alternativo y la predicción indica que no tienen relevancia clínica.

La variante nueva c.64G>C (p.Asp22His), se localiza en el exón 1 de *TH*, de acuerdo al análisis *in silico* en *PholyPhen-2* y *Mutation Taster* se identificó que el ácido aspártico se encuentra altamente conservado en diversas especies y se predice como una variante probablemente dañina. Al sustituir el ácido aspártico por la histidina se demuestra el potencial de patogenicidad debido al cambio de naturaleza del aminoácido con propiedades ácidas por básicas. Adicional a esto, es importante considerar que la variante se encuentra muy cerca de la serina 19, el cual es un sitio principal de fosforilación encargado de la regulación de la función de la tirosina hidroxilasa (Nagatsu et al. 2018), que de ser afectado estéricamente resultaría en la inactivación de la función de la enzima.

Se identificaron también cuatro variantes ya reportadas, en el caso de c.334G>A (rs6356, p.Val112Met) ubicada en el exón 3 de *TH*, es considerada como variante benigna por *Ensembl*. Sin embargo, en el estudio de Yan y cols. (2018) los resultados mostraron una frecuencia significativamente diferente entre pacientes con enfermedad de Parkinson (EP) de inicio tardío e individuos control (p=0.0041), considerándola como un factor de protección

para la EP debido a que la frecuencia en controles (24,42%) es mayor que en pacientes con EP (19,12%). La posición en la que se encuentra la sustitución de la valina por metionina corresponde al dominio regulador y de estabilidad intracelular, por lo que podría promover el metabolismo de dopamina confiriéndole el efecto de protección contra enfermedades relacionadas a esta deficiencia (Yan et al, 2018).

En el caso de la variante c.1321C>T (rs575326605, p.Arg441Trp) ubicada en el exón 13 de *TH*, el análisis *in silico* en *PholyPhen-2* y *Mutation Taster* mostró que el aminoácido arginina 441 es un residuo altamente conservado evolutivamente y su predicción fue de variante probablemente dañina. La sustitución de esta arginina puede afectar la capacidad catalítica de la enzima y reducir la producción de dopamina, ya que al encontrarse en el dominio catalítico de la TH se produce una proteína con actividad catalítica escasa o no detectable que contribuye al fenotipo de DRD (Yan et al, 2017)

Las variantes g.2169925T>C y g.2167955G>A se predicen como cambios benignos según Ensembl. Debido a que no existe un punto caliente o frecuente de mutaciones en la secuencia de *TH*, se recomienda la secuenciación completa del gen.

La variante p.Asp22His se encuentra en el 5% de los pacientes analizados, al tratarse de una variante no reportada con anterioridad se desconocen los valores de frecuencia necesaria para establecer una comparativa con otras poblaciones. Deberá determinarse su frecuencia en controles sanos de nuestra población para establecer su frecuencia.

La frecuencia de la variante p.Arg441Trp en este estudio es del 5%, valor que es muy similar a lo reportado en un estudio realizado a 12 familias en China, en el que la variante se presentó en el 8% de los casos (Yan et al, 2017).

La variante p.Val112Met se encuentra en el 32% de los pacientes analizados que presentan cuadros mixtos de distonías con parkinsonismo, frecuencia ligeramente más elevada comparada con un estudio realizado en China, en el cual la frecuencia es de 19,12% (Yan et al, 2018).

Los resultados positivos para TH fueron informados al médico genetista del Departamento para que éste diera asesoramiento genético a los pacientes y sus familiares. Así mismo se informaron los resultados a los neurólogos de la Clínica de movimientos anormales para el seguimiento y tratamiento de los pacientes.

### 13. CONCLUSIONES

---

Se analizaron las muestras que cumplían con los criterios de pureza concentración e integridad.

Se estandarizaron las condiciones de reacción para las PCR en las cuales se ajustó la temperatura y cantidad de reactivo para cada pareja de oligonucleótidos.

Se amplificaron los exones de los genes de TH confirmando su presencia por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Debido a fallas técnicas de los equipos utilizados, no se realizó la secuenciación de los exones de GCH1.

El fenotipo relacionado a DRD se explica por las variantes probablemente dañinas en el 10% (n=19) de los pacientes estudiados, los resultados sugieren la afección de otros genes relacionados con los fenotipos correspondientes a DRD.

Se identificaron dos variantes de sentido erróneo en la secuenciación del gen *TH*, que por medio de la predicción *in silico* se consideran como probablemente dañinas de manera que explicarían el cuadro clínico de los pacientes.

### 14. RECOMENDACIONES

---

Se recomienda realizar el análisis del gen GCH1 como seguimiento del presente estudio.

Se recomienda realizar el análisis del gen *SPR* debido a que la enzima resultante también participa en la biosíntesis de dopamina y está estrechamente relacionada funcionalmente con *GCH1* y *TH*, de acuerdo con Furukawa y cols. (2019). Por ello, la deficiencia de la enzima sepiapterina reductasa (*SPR*) es un factor a considerar en el diagnóstico diferencial de las DRD que fueron negativas en este estudio.



## 15. REFERENCIAS

---

- Albanese, A., Bhatia, K., Bressman, S.B., Delong, M.R., Fahn, S., Fung, V.S., Hallett, M., Jankovic, J., Jinnah, H.A., Klein, C., Lang, A.E., Mink, J.W., & Teller, J.K. (2013). Phenomenology and classification of dystonia: A consensus update. *Movement Disorders*, 28(7), 863–873.
- Arango, G.J. (2017). Genética de las distonías. *Acta Neurológica Colombiana*, 33(Suppl. 1), 14-19.
- Balint, B., Mencacci, N. E., Valente, E. M., Pisani, A., Rothwell, J., Jankovic, J., Vidailhet, M., & Bhatia, K. P. (2018). Dystonia. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1).
- Cai, C., Shi, W., Zeng, Z., Zhang, M., Ling, C., Chen, L., Cai, C., Zhang, B., Li, W. (2013) GTP Cyclohydrolase I and Tyrosine Hydroxylase Gene Mutations in Familial and Sporadic DopaResponsive Dystonia Patients. *PLoS ONE*, 8(6), e65215.
- Chacon-Cortes, D., & Griffiths, L. (2014). Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*, (2), 1-9.
- Dávila-Ortiz de Montellano, D.J., González-Del Rincón, M.L., Monroy-Jaramillo, N., Abundes-Corona, A., Ospina-García, N., Rodríguez-Violante, M., Leal-Ortega, R., Paisan-Ruiz, C., López-López, M. (2020). First report of pathogenic SGCE variants in Mexican patients with myoclonus dystonia: A five-year follow-up study. *Parkinsonism Relat Disord*. (79), 117-120.
- Furukawa Y.(2019) GTP Cyclohydrolase 1-Deficient DopaResponsive Dystonia. *GeneReviews*.(Internet).
- Gomes, A., & Korf, B. (2018). Genetic Testing Techniques. En *Pediatric Cancer Genetics* (47–64). Missouri, E.U.A.. Elsevier.
- Jinnah, H.A., & Sun, Y.V. (2019). Dystonia genes and their biological pathways. *Neurobiology of Disease*. 129 (Septiembre 2019), 159-168.
- Kim, R., Jeon, B., & Lee, W.W. (2016). A Systematic Review of Treatment Outcome in Patients with Dopa-responsive Dystonia (DRD) and DRD-Plus. *Movement Disorders Clinical Practice*, 3(5), 435–442.
- Klein C. (2014). Genetics of dystonia. *Parkinsonism and Related Disorders*; 20S1, S137–S142.
- Lohmann, K., & Klein, C. (2017). Update on the Genetics of Dystonia. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 17(26).

Nagatsu, T., Nakashima, A., Ichinose, H., & Kobayashi, K. (2018). Human tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease and in related disorders. *Journal of Neural Transmission*, *126*(4), 397-409.

Ospina-García, N., Rodríguez-Violante, M. & Cervantes-Arriaga, A. (2018). Etiología, fenomenología, clasificación y tratamiento de la distonía. *Revista Mexicana de Neurociencia*; *19* (4), 94-107.

Randby, H., Salvador, C.L., Oppebøen, M., Skogseid, I.M., & Koht, J. (2018) Dopa-responsive dystonia. *Tidsskr Nor Laegeforen*, *138*(19), 1842-1847.

Shetty, A. S., Bhatia, K. P., & Lang, A. E. (2019). Dystonia and Parkinson's disease: What is the relationship?. *Neurobiology of Disease*. (132). 104462.

Szigetvari, P. D., Muruganandam, G., Kallio, J. P., Hallin, E. I., Fossbakk, A., Loris, R., Møller, L.B., Knappskog, P.M., Kursula, P., & Haavik, J. (2019). The quaternary structure of human tyrosine hydroxylase: effects of dystonia-associated missense variants on oligomeric state and enzyme activity. *Journal of Neurochemistry*, *148*(2), 291-306.

The human gene mutation database (HGMD). Gene GCH1. Consultado en febrero 2020. Disponible en: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=GCH1>

The human gene mutation database (HGMD). Gene TH. Consultado en febrero 2020. Disponible en: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=TH>

Wijemanne, S., & Jankovic, J. (2015). Dopa-responsive dystonia—clinical and genetic heterogeneity. *Nature Reviews Neurology*, *11*(7), 414–424.

Xiao, J., Vemula, S.R., & LeDoux, M.S. (2014). Recent Advances in the Genetics of Dystonia. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, *14*(8).

Yan, Y., Zhang, B., Mao, Y., Guo, Z., Tian, J., Zhao, G., Pu, J., Luo, W., Ouyang, Z., Zhang, B. (2017). A novel tyrosine hydroxylase variant in a group of Chinese patients with dopa-responsive dystonia. *International Journal of Neuroscience*, *127*(8), 694–700.

Yan, Y., Zhang, B., Shen, T., Si, X., Guo, Z., Tian, J., Xu, C., Zhang, B. (2018). Study of GCH1 and TH genes in Chinese patients with Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *68*, 159.e3–159.e6.

## 16. ANEXOS

---

### i. Anexo 1. Consentimiento informado



## INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA “MVS”

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**PROTOCOLO INNN 155/18: Evaluación clínica y molecular de pacientes con distonías tipo DYT1, DYT5a, DYT5b, DYT6, DYT12 y DYT16.**

Antes de participar en el estudio que se le ha propuesto, es importante que esté informado acerca de las características del mismo y que esté de acuerdo con los procedimientos a los que será sometido. **SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO ES COMPLETAMENTE VOLUNTARIA.** Esta investigación está respaldada por el Comité de Ética y de Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN).

He sido informado que padezco distonía. La distonía es un trastorno del movimiento en el cual suceden contracciones involuntarias de músculos, causantes de movimientos lentos y repetitivos en el paciente. Actualmente se conocen parcialmente los mecanismos que determinan la aparición de la distonía. Existe evidencia de que los factores genéticos pueden contribuir al desarrollo de las mismas.

#### **OBJETIVO DEL ESTUDIO**

Determinar la prevalencia y el impacto de variantes genéticas de secuencia y estructurales en el DNA (material genético) de pacientes mestizo-mexicanos con diagnóstico clínico de distonía. Los resultados de este protocolo nos permitirán identificar factores causales para el desarrollo de esta enfermedad.

#### **PROCEDIMIENTOS A REALIZARSE**

En primera instancia se me realizará una historia clínica completa, la cual incluye la elaboración de árbol genealógico, con la finalidad de identificar a otros familiares que posiblemente estén afectados, así como a las personas que estén en riesgo de desarrollar la enfermedad en el futuro. A continuación, se me tomará una muestra de sangre periférica

de la cual se extraerá el DNA (material genético) y se estudiarán diferentes variaciones genómicas asociadas con estas enfermedades.

### **EFFECTOS INDESEABLES Y RIESGOS**

Cuando la sangre es obtenida, usted podrá experimentar un leve dolor en el sitio de punción. Raras veces ocurren infecciones o inflamación local.

### **CONFIDENCIALIDAD**

La información clínica recopilada es estrictamente confidencial. El nombre de los participantes nunca aparecerá en ningún reporte o publicación, pues para el desarrollo del estudio se siguen los reglamentos internos del INNN.

### **CONSIDERACIONES ECONÓMICAS**

El estudio de su muestra no tendrá ningún costo para usted.

### **RESULTADOS**

Este estudio es a largo plazo (3 años) y requiere de la participación de un gran número de pacientes con esta enfermedad. Una vez terminado el estudio si los resultados son de relevancia para usted se le contactará para comunicárselos y explicárselos.

### **CONTACTOS**

Si usted considera que los puntos antes mencionados no están claros, o le surgen nuevas dudas puede dirigirse directamente con las responsables de este estudio. Las personas responsables son el Dr. David J. Dávila Ortiz de Montellano y la Dra. Nancy Monroy del Departamento de Neurogenética y se puede comunicar con cualquiera de ellas al Tel. (55) 56 06 38 22 Ext. 2018. En caso de así requerirse, los pacientes también pueden acudir al Comité de Ética en Investigación, al teléfono 56 06 38 22 ext. 5027.

### **CONSENTIMIENTO**

**Gracias por tomarse el tiempo de leer detenidamente esta información y por participar en el estudio.**

A través de la presente, otorgo mi consentimiento para participar como voluntario en el protocolo de investigación **“Evaluación clínica y molecular de pacientes con distonías tipo DYT1, DYT5a, DYT5b, DYT6, DYT12 y DYT16”**.

Hago constar que he recibido toda la información acerca de la naturaleza y propósito del estudio. He recibido, leído y entendido la carta de información del estudio, así como el riesgo descrito. Se me ha informado que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento. Entiendo que recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de



consentimiento. Estoy de acuerdo que la información clínica derivada del estudio de mi caso sea informada a la comunidad médica verbalmente o por escrito, pero sin revelar mi identidad.

---

**Nombre y firma del voluntario**

---

**Nombre y firma del testigo 1**

---

**Nombre y firma del testigo 2**

---

**Nombre y firma del investigador que obtuvo el consentimiento**

## **j. Anexo 2. Amortiguador SB**

El amortiguador de borato de sodio (SB) permite que las electroforesis con geles de agarosa se realicen con un voltaje más alto, aumentando la velocidad de separación de DNA.

### **Preparación del amortiguador de boratos de sodio SB (1X)**

1. Añadir 8 g de NaOH a 900 mL de agua bidestilada y agitar hasta disolver completamente, se obtiene una solución 200 mM de NaOH a pH 8.0.
2. Añadir 47 g de ácido bórico a la solución de NaOH 200 mM y agitar hasta homogenizar.
3. Llevar a volumen de 1 L y filtrar, se obtiene una solución amortiguadora stock SB (20X).
4. Determinar el pH considerando aceptable un valor de  $8.0 \pm 0.2$ .
5. Esterilizar la solución por filtración, empleando un papel filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.
6. Transferir 100 mL de la solución filtrada a un recipiente de 2 L y completar al volumen con agua bidestilada. Finalmente se obtiene una solución amortiguadora SB (1X).