



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo

Unidad Xochimilco

REPORTE DE SERVICIO SOCIAL

**ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN *TOR1A*
ASOCIADO A DISTONÍA TIPO 1**

ITZEL JAQUELINE SURIANO FABIAN

ASESOR INTERNO: Dr. Alberto Ortega Vázquez

ASESOR EXTERNO: Dra. Nancy Monroy Jaramillo

30/01/2020

I. Contenido

II. DATOS GENERALES	4
III. JUSTIFICACIÓN	5
IV. OBJETIVOS.....	5
A. OBJETIVO GENERAL	5
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
V. MARCO TEÓRICO.....	6
A. DISTONÍAS	6
B. DISTONÍA GENERALIZADA TIPO I (DYT1)	6
C. GEN <i>TORIA</i> (<i>TORSIN FAMILY 1 MEMBER A</i>)	6
D. PROTEÍNA TORSINA-1A	7
E. DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	7
F. MÉTODO DE ANÁLISIS MOLECULAR PARA EL DIAGNÓSTICO DE DYT1	8
1. <i>Amplificación de sondas dependientes de ligando (MLPA)</i>	8
2. <i>Secuenciación tipo Sanger</i>	9
VI. METODOLOGÍA	10
A. SUJETOS.....	10
B. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO	11
C. ANÁLISIS DE AMPLIFICACIÓN DE SONDAS DEPENDIENTES DE LIGANDO (MLPA).....	11
D. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	14
E. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.....	15
F. MÉTODO DE ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	16
VII. RESULTADOS.....	17
A. ANÁLISIS CUALITATIVO DEL DNA	17
B. ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL DNA.....	18
C. ESTANDARIZACIÓN DE PCR	18
D. AMPLIFICACIÓN DE SONDAS DEPENDIENTES DE LIGANDO (MLPA)	19
E. SECUENCIACIÓN TIPO SANGER	20
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	22
IX. CONCLUSIONES.....	23
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

XI. ANEXOS	25
A. ANEXO 1.....	25
B. ANEXO 2.....	27
C. ANEXO 3.....	27
D. ANEXO 4.....	28

II. Datos generales

Lugar de realización

Departamento de Neurogenética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, departamento de genética.

Periodo de realización.

Del 29 de abril al 28 de noviembre de 2019

Protocolo de participación

Evaluación clínica y molecular de pacientes con distonías tipo DYT1, DYT5a, DYT5b, DYT6, DYT12 y DYT16.

Lugar de procedencia:

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División:

División Ciencias Biológicas de la Salud

Licenciatura

Química Farmacéutica Biológica

Asesores

Asesor interno: Dr. Alberto Ortega Vázquez

Asesor externo: Dra. Nancy Monroy Jaramillo

III. Justificación

A pesar de que la mayoría de los casos con distonía tipo 1 (DYT1) presentan un cuadro clásico y portan la delección de tres nucleótidos en el gen *TORIA*, existen casos con fenotipo atípico donde debe hacerse un diagnóstico diferencial, con fenotipos de distonía respondedora a dopamina por variante en el gen *GCHI*, distonía tipo 6, DYT6 (*THAP1*) y distonía tipo 25, DYT25 (*GNAL*) (Fuchs et al. 2013) que pueden presentar cuadros clínicos similares a los de DYT1 (GeneReviews, 2016). Asimismo, existen otras formas genéticamente aún no identificadas, con distonía con patrón de herencia autosómico dominante (AD) de inicio temprano y distonías aisladas de inicio temprano que se heredan de forma recesiva (Charlesworth et al. 2015).

Es importante implementar técnicas genómicas que nos permitan identificar el gen causal de la enfermedad de manera inequívoca. Una vez identificada la variante patogénica, puede brindarse asesoramiento genético a los pacientes y a sus familiares en riesgo. Todas las variantes nuevas que se identifiquen en *TORIA* se investigarán en controles.

IV. Objetivos

A. Objetivo general

Implementar una estrategia integral (clínica y molecular) en los pacientes con distonía generalizada.

B. Objetivos específicos

Analizar la secuencia del gen *TORIA* en pacientes con diagnóstico clínico de distonía generalizada y de inicio temprano.

Analizar la dosis del gen *TORIA* en pacientes con diagnóstico clínico de distonía generalizada.

V. Marco teórico

A. Distonías

Las distonías son un trastorno del movimiento heterogéneo caracterizado por contracciones musculares sostenidas o intermitentes que producen movimientos repetitivos, posturas anormales o ambos, se presentan en patrones de torsión y temblor (Albanese et. al. 2013; Carvalho et. al. 2002).

Las distonías se clasifican de acuerdo a la edad de inicio en la que se presentan (infancia, adolescencia y tipo etapa adulta); etiología (idiopática y sintomática) y de acuerdo a su distribución en el cuerpo (focal, segmentaria, generalizada, multifocal y hemidistonía) (Siokas et. al. 2019).

Es importante identificar los factores genéticos asociados con las distonías pues dependiendo de las variantes genéticas, éstas pueden modificar la presentación de la distonía, incluyendo edad de inicio y grado de penetrancia (Siokas et al. 2019).

B. Distonía generalizada tipo I (DYT1)

La DYT1 es un trastorno neurológico del desarrollo que afecta al cerebro y recientemente se clasificó como parte de la distonía aislada generalizada de inicio temprano. Es una de las formas hereditarias más comunes de distonía, con un patrón de herencia AD y se caracteriza por una contracción sostenida de los músculos en las extremidades y el tronco, lo que resulta en una postura torcida. Se cree que la fisiopatología de la distonía DYT1 surge de anomalías en la transmisión sináptica, los microcircuitos neuronales y/o en redes neuronales a gran escala (Mitchell et. al. 2018).

La DYT1 es causada en la mayoría de los casos por una variante en el gen *TOR1A* (c.907_909delGAG, p.Glu302/303del, p.delE302/303, rs80358233), que codifica a la proteína torsina A. Esta variante resulta en una supresión del codón para el ácido glutámico 303 dentro del marco de lectura; pero debido a que en la secuencia son dos ácidos glutámicos contiguos, se le denomina E302/303 (Mitchell et. al. 2018).

C. Gen *TOR1A* (*torsin family 1 member A*)

El gen *TOR1A* contiene 5 exones y se localiza en 9q34.11. Este gen se expresa de manera prominente en la *sustancia nigra pars compacta* y codifica para la proteína torsina. En *TOR1A* se han documentado 18 variantes (HGMD 2020) que se asocian a distonía 1 de torsión. El fenotipo de la *DYT1* es una distonía generalizada, de inicio temprano, que usualmente inicia en extremidades inferiores (distonía de torsión) (Beauvais et. al. 2018).

La proteína *TOR1A* es una ATPasa que se localiza en retículo endoplásmico y se asocia con varias funciones celulares, incluyendo su acción como chaperona. De manera interesante, *THAP1* (asociado a *DYT6*) se une al promotor de *TOR1A* y regula su expresión (Kaiser et. al. 2010). De tal forma que las *DYT1* y *DYT6* están relacionadas molecularmente con un punto de convergencia de disfunción neuronal a nivel de la ruta del factor de inicio de la

traducción, eIF2 α y por lo tanto, se pueden presentar semejanzas fenotípicas para ambas distonías (Zakirova et. al. 2018).

La variante genética causante de *DYT1*, c.907_909delGAG (p.Glu303del) en el gen *TOR1A*, se presenta en la mayoría de los casos de *DYT1* confirmados genéticamente y se encuentra en aproximadamente el 80% de los casos de judíos Ashkenazi debido a un efecto fundador; así como en casi el 50% de los pacientes con distonía generalizada en poblaciones no judías. La penetrancia de la variante c.907_909delGAG es reducida (aproximadamente 35%) (Dobričić et.al. 2015).

D. Proteína torsina-1A

La Torsina-A presenta funciones de chaperona, es importante para el control del plegamiento, el procesamiento, la estabilidad y la localización de diferentes proteínas, así como para la reducción de los agregados de proteínas mal plegados. Está implicada en la regulación del reciclaje de vesículas sinápticas, controla la estabilidad de la proteína STON2 en colaboración con el complejo de señalosoma COP9 (CSN). En el núcleo, la Torsina A puede vincular el citoesqueleto con la envoltura nuclear, este mecanismo parece ser crucial para el control de la polaridad nuclear, el movimiento celular y, específicamente en las neuronas, modula la integridad de la envoltura nuclear. También participa en el tráfico celular y puede regular la ubicación subcelular de las proteínas de membrana multipaso como el transportador de dopamina SLC6A3, lo que conduce a la modulación de la neurotransmisión de dopamina. En el retículo endoplásmico, desempeña un papel en el control de calidad del plegamiento de proteínas al aumentar la eliminación de proteínas mal plegadas o mantenerlas en un estado intermedio para un replegamiento adecuado. Además, se ha postulado que la Torsina A tiene una función redundante con TOR1B en tejidos no neurales (UNIPROT, 2019).

E. Diagnóstico molecular

El diagnóstico de *DYT1* se establece en un probando por la identificación de una variante patogénica heterocigótica en el gen *TOR1A* mediante pruebas moleculares (Campbell et. al. 2012).

Las pruebas moleculares pueden incluir un solo gen o emplear un panel multigénico, también están las pruebas genómicas (exoma o genoma completo). Debido a que la variante c.907_909delGAG es la variante patogénica más frecuente en *TOR1A* asociada con la distonía aislada de inicio temprano *DYT1*, primero se puede realizar un análisis dirigido para esta variante específica (Campbell et. al. 2012).

En ausencia de esta variante, se realizará análisis de secuencia de *TOR1A*, que puede ser seguido por un análisis de deleciones/ duplicaciones del gen si no se encuentra una variante patogénica de secuencia; sin embargo, dado que la distonía aislada de inicio temprano se produce por un mecanismo dominante negativo y no se ha reportado una gran eliminación o duplicación intragénica, es poco probable que las pruebas de detección de deleciones o

duplicación intragénicas identifiquen una variante causante de la enfermedad. A la fecha, sólo se han reportado dos casos con grandes deleciones (1.9-2.3 Mb) en la región del cromosoma 9, conteniendo a *TORIA* y hasta 35 genes contiguos. Estos casos se presentan con rasgos adicionales como discapacidad intelectual, hipotonía y características dismórficas (Campbell et. al. 2012).

F. Método de análisis molecular para el diagnóstico de DYT1

1. Amplificación de sondas dependientes de ligando (MLPA)

La amplificación de sondas dependientes de ligando (MLPA) se basa en la amplificación de hasta 60 sondas que detectan una secuencia de DNA específica de aproximadamente 60 nt de longitud. La reacción de MLPA da como resultado un conjunto de amplicones de PCR entre 64-500 nt en longitud que son separados por electroforesis capilar. Después de la desnaturalización inicial de la muestra de DNA, se agrega una mezcla de sondas MLPA a la muestra. Cada sonda del MLPA consta de dos oligonucleótidos que deben hibridarse con secuencias diana directamente adyacentes para unirse en una sola sonda. Durante la reacción de PCR posterior, todas las sondas ligadas se amplifican simultáneamente usando el mismo par de cebadores de PCR, lo que da como resultado un conjunto de amplicones de PCR de longitud diferente. Un cebador de PCR está marcado con fluorescencia (6-FAM en su extremo 5'), lo que permite visualizar los productos de amplificación durante la separación de fragmentos en un instrumento de electroforesis capilar (Fig. 1) (MRC Holland, 2019).

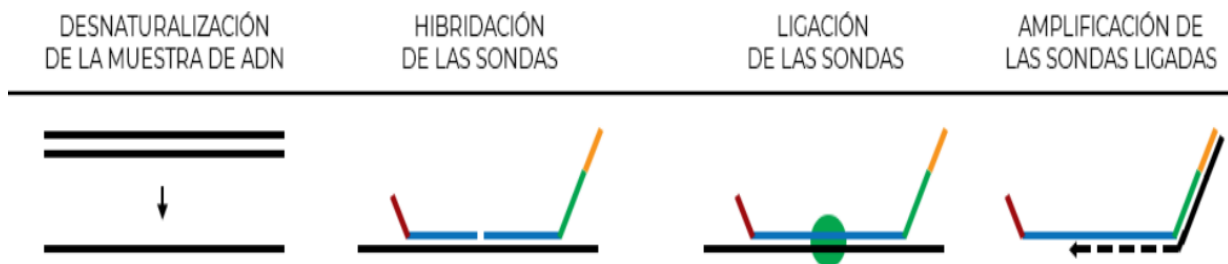


Figura 1. Fundamento de la técnica de MLPA (tomado de MRC Holland, 2019).

El MLPA puede detectar diferencias relativas al comparar los patrones de altura de cada pico de los amplicones. La altura relativa de cada pico de sonda individual, en comparación con las alturas de pico de sonda relativas en varias muestras de DNA de referencia, refleja el número relativo de copias de la secuencia objetivo correspondiente en una muestra. Por lo tanto, la inclusión de muestras de referencia en la misma ejecución es esencial. Una eliminación (deleción) de una o más secuencias objetivo es visible como una disminución relativa en la altura; mientras que, un aumento en la altura del pico relativo refleja un aumento en el número de copias (duplicaciones) (MRC Holland, 2019).

a) Panel de SALSA® MLPA P059 B2 para Distonías (MRC-Holland)

El panel comercial *SALSA MLPA Probemix P059 Dystonia* es un ensayo de uso exclusivo de investigación para la detección de deleciones o duplicaciones en *TOR1A* (distonía generalizada de inicio temprano; 'DYT1'), *THAP1* (distonía segmentaria/generalizada de inicio adolescente; 'DYT6'), y en los genes *ATP1A3* ('DYT12') y *PRKRA* ('DYT16'), que están asociados con distonía de inicio temprano con parkinsonismo y distonía autosómica recesiva con parkinsonismo, respectivamente. Este panel también incluye una sonda para detectar la presencia de la deleción de 3 pb c.907_909delGAG que involucra la secuencia GAG altamente conservada en el exón 5 de *TOR1A* (MRC-Holland, 2019).

El panel comercial de MLPA contiene 44 sondas con productos de amplificación entre 130 y 483 nt. Se incluyen seis sondas para el gen *TOR1A*, incluida una sonda específica para la variante c.907_909delGAG, tres sondas para *THAP1*, 17 sondas para *ATP1A3* y nueve para el gen *PRKRA*. Además, se incluyen nueve sondas de referencia que detectan diferentes ubicaciones cromosómicas autosómicas de copia única para normalizar los resultados.

2. Secuenciación tipo Sanger

El método enzimático de Sanger utiliza una DNA polimerasa e inhibidores que finalizan la cadena de DNA que está siendo sintetizada en lugares específicos, particularmente utiliza dideoxinucleótidos (nucleótidos que en su carbono 3' no tienen el grupo hidroxilo). La incorporación de una base con estas características en una molécula "naciente" de DNA impide que una nueva base pueda incorporarse y la síntesis de DNA es interrumpida (Greif G, s.f.)

La DNA polimerasa requiere de un templado de DNA de cadena sencilla para realizar la síntesis de la hebra complementaria extendida a partir de un iniciador en dirección de 5' a 3'. Con este método se generan fragmentos de DNA de todos los tamaños posibles que se puedan distinguir entre sí, por el tipo de marcaje que llevan o por la incorporación de un terminador específico. Inicialmente, la estrategia era realizar cuatro reacciones diferentes de síntesis de DNA, esto usando ddNTP diferentes (Necochea y Canul, 2004). A partir de 1986 se publicó el primer reporte de automatización de la secuenciación de DNA donde empleaban terminadores fluorescentes como variante del método de Sanger, utilizando una molécula fluorescente diferente unida a cada dideoxinucleótido y permitiendo realizar la reacción en un único tubo (Fig. 2) (Greif G, s.f.)

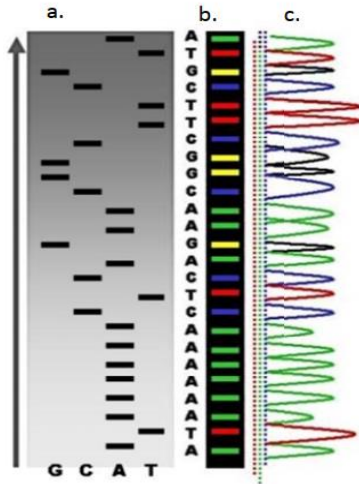


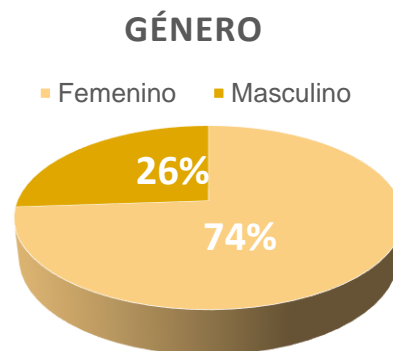
Figura 2. a) Resultado de método Sanger tradicional radioactivo; b) resultado de método Sanger semiautomatizado y c) electroferograma con la variante de Sanger. Tomada de Greif G, s.f.

VI. Metodología

A. Sujetos.

Siguiendo las consideraciones éticas de acuerdo al protocolo de investigación 155/18 que fue aprobado por los Comités de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, INNN. Todos los participantes firmaron una carta de consentimiento informado (Anexo 1).

Se incluyeron 23 pacientes mestizo-mexicanos (MM), con al menos dos generaciones de ancestros mexicanos que contaban con diagnóstico clínico de probable distonía generalizada de inicio temprano (DYT1) por la Clínica de Movimientos Anormales del INNN (Gráfica 1 y Tabla 1).

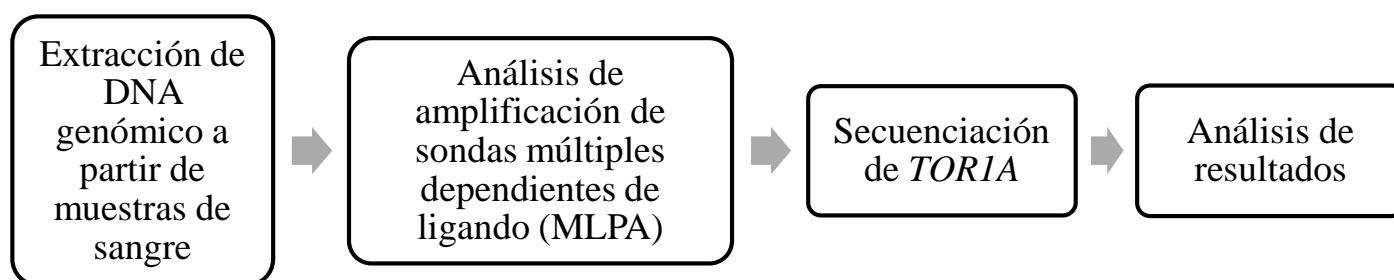


Gráfica 1. Distribución por género de pacientes con DYT1 analizados en el presente estudio.

Tabla 1. Rango de edades de pacientes analizados.

GÉNERO	RANGO DE EDAD (AÑOS)
FEMENINO	7 – 59
MASCULINO	10 – 32

La Figura 3 muestra el orden secuencial de los procesos realizados.



B. Extracción de DNA genómico

En un lapso no mayor a 3h después de la obtención de muestras sanguíneas, se separó 1 mL de plasma y se preservó a -70°C para su posterior uso. De 3 mL de muestra sanguínea se separaron las células mononucleares (CMN), se dividieron en 2 tubos y se agregó *RNA later* (AMBION) como estabilizador para preservar las células. Las CMN se congelaron inmediatamente a -70°C . Del remanente de sangre se extrajo DNA genómico por método salino y se almacenó a -20°C . Se llevó a cabo análisis cualitativo y cuantitativo del DNA genómico y se realizaron alícuotas de trabajo a una concentración de $50\text{ ng}/\mu\text{L}$ de DNA.

La integridad del DNA genómico se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con SB 1X como amortiguador (ver anexo 2), 80 volts/45 min. Se empleó marcador de peso molecular de la marca *Thermo Scientific GeneRuler™ DNA Ladder, Low Range*.

C. Análisis de amplificación de sondas dependientes de ligando (MLPA)

Las duplicaciones y deleciones de los genes *THAP1* (DYT6), *ATPIA3* (DYT12), *PRKRA* (DYT16) y *TORIA* se analizó mediante el método de MLPA mediante el panel comercial SALSA® MLPA *Probemix P059 B1 Dystonia* (MRC-Holland) el cual contiene los genes *THAP1* (DYT6), *ATPIA3* (DYT12), *PRKRA* (DYT16) y *TORIA*, para este último, también contiene la sonda que reconoce la variante p.Glu302/303del. Amortiguador TE (ver anexo 3) (pH: 8.0) (esterilizar por

filtración). Todas las muestras de DNA se diluyen a 100 ng/μL. el análisis se realiza en las siguientes condiciones: Desnaturalización (98°C, 5min), hibridación (95°C, 1 min; pausa a 60 °C por 16 a 20 h), reacción de ligación y PCR.

- Dilución de la muestra de 100ng/μL a 20 ng/μL llevando a volumen de 50 μL con amortiguador TE.

El método de MLPA consta de 4 pasos:

1. Desnaturalización (98°C, 5min)
2. Hibridación (95°C, 1 min; pausa a 60 °C por 16 a 20 h)
3. Reacción de ligación
4. PCR

El procedimiento toma dos días, por lo que se verifica previamente la existencia de reactivos a usar:

- Panel comercial SALSA® MLPA *Probemix* P059 B1 *Dystonia* (MRC-Holland) el cual contiene los genes *THAP1* (DYT6), *ATP1A3* (DYT12), *PRKRA* (DYT16) y *TORIA*, para este último, también contiene la sonda que reconoce la variante p.Glu302/303del.
- Amortiguador TE (ver anexo 3) (pH: 8.0) (esterilizar por filtración).

Preparación de las muestras de DNA:

- Dilución de muestras problema y controles a 100 ng/μL.
- Dilución de la muestra de 100ng/μL a 20 ng/μL llevando a volumen de 50 μL con amortiguador TE.

Transferir 5μL del DNA diluido a tubos de 200μL (tubo 1).

Día 1. Reacción de hibridación

Se preparó la mezcla 1 como sigue:

- 0.75 μL amortiguador de MLPA
- 0.75 μL mezcla de las sondas

Se introducen los tubos 1 en el termociclador con el programa de trabajo (Fig. 4) y cuando la temperatura desciende a 25°C, se agrega 1.5 μL de la mezcla 1 a cada tubo. Así se deja la reacción por 16-20 h.

Día 2. Reacción de ligación y PCR

Se prepara la mezcla 2, como sigue:

- 1.5 μL amortiguador LA de ligación
- 1.5 μL amortiguador LB de ligación

- 12.5 μL agua libre de DNAsas
- 0.5 μL enzima ligasa (NO VORTEX)

Concluida la reacción de hibridación, se detuvo la reacción y se seleccionó el programa de ligación-PCR (Fig.5), al llegar a la temperatura de 54 °C, se agregaron 16 μL de la mezcla 2 al tubo1.

A la temperatura de 20°C, se agregaron 5 μL de la mezcla 3 que contenía:

- 1 μL de SALSA PCR
- 0.25 μL SALSA DNA polimerasa
- 3.75 μL agua libre de DNAsas

Al término de la reacción, la muestra se conservó a 4°C por no más de una semana hasta su análisis mediante electroforesis capilar. La reacción se conservó protegida de la luz.

La muestra se preparó como sigue para la electroforesis capilar:

- 0.2 μL de marcador de pesos GeneScan™ -500 LIZ
 - 8.8 μL de formamida desionizada
 - μL de la reacción de MLPA
- } Cantidades por /muestra.

Esta reacción se separó por electroforesis capilar en un equipo AB3130. Siguiendo las instrucciones del proveedor, se incluyeron controles y los resultados se analizaron con el programa *Coffalyzer.net*

En aquellas muestras de DNA que presentaron MLPA normal, se procedió a la reacción de secuenciación.

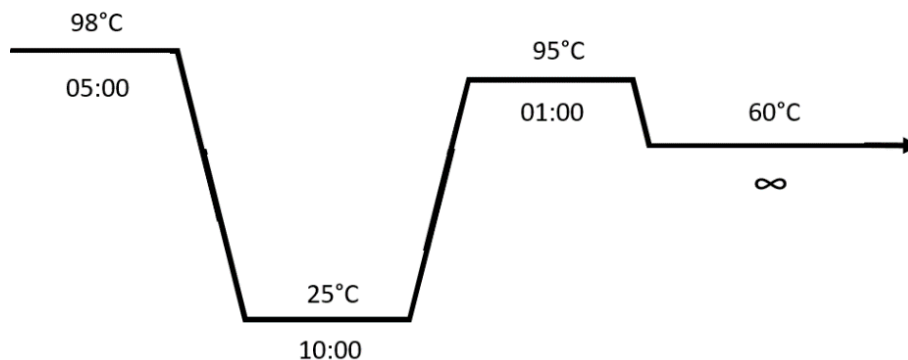
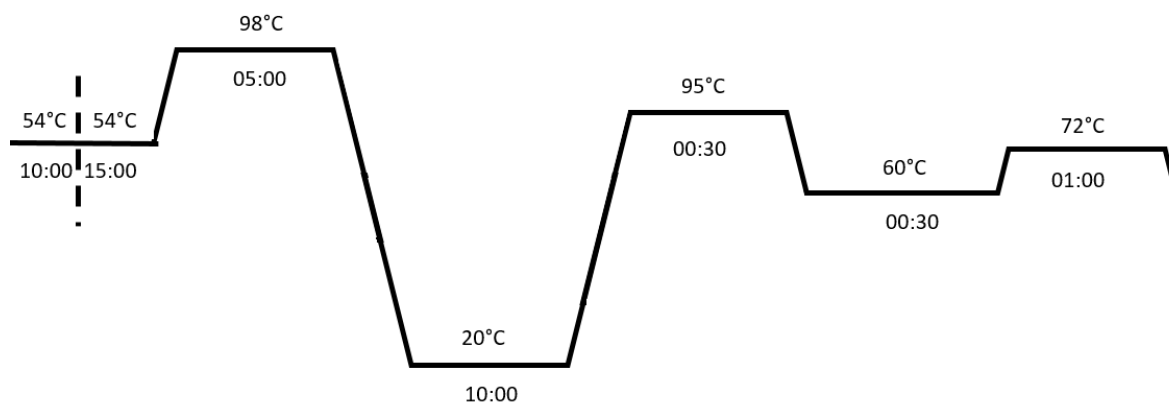


Figura 4. Condiciones de tiempos y temperaturas para la reacción de hibridación del día 1 del proceso del MLPA.

Figura 5. Condiciones de tiempo y temperatura para reacción de ligación y PCR del día 2 de MLPA.



D. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las muestras negativas en MLPA se analizaron mediante secuenciación, donde inicialmente se requiere amplificar por PCR la región promotora y los cinco exones de *TOR1A*. Para ello, se prepararon alícuotas de las muestras de DNA a una concentración de 50 ng/ μ L y alícuotas de los oligonucleótidos (Tabla 2) a una concentración de 10 μ M.

La amplificación del gen *TOR1A* se realizó con las condiciones de tiempo y temperatura de la figura 6 en un termociclador *Applied Biosystems 9700*.

Tabla 2. Secuencia nucleotídica y nombre de oligonucleótidos usados en las PCR del gen *TOR1A*.

NOMBRE DE LA SECUENCIA	SECUENCIA 5' A 3'
DYT1_5F (gag205)	CCTGGAATACAAACACCTA
DYT1_5R (gag205)	GGCTGCCAATCATGACTGTC
TOR1A_PROM_297F	GCAAAACAGGGCTTTGTACCG
TOR1A_PROM_297R	AGTAGAGACGCGGGTAGATG
TOR1A_PROM_140F	GCGTCTCTACTGCCTCTTCG
TOR1A_PROM_140R	ATGCCCTGGTCCTAGTTCAG
TOR1A_2F_410	GGTTTCGCAAGGTGCTTGGA
TOR1A_2R_410	GGGATTCCAACTTCCATCC
TOR1A3-4F_804	TCCATGGGGTTGGTAGGAAC
TOR1A3-4R_804	GGTGACAGAGTAAACTATCTG
TOR1A_5F_640	GACCCCCAGTAGACGTTTGT
TOR1A_5R_640	GTAAAAAATCATGAGCCCTGC

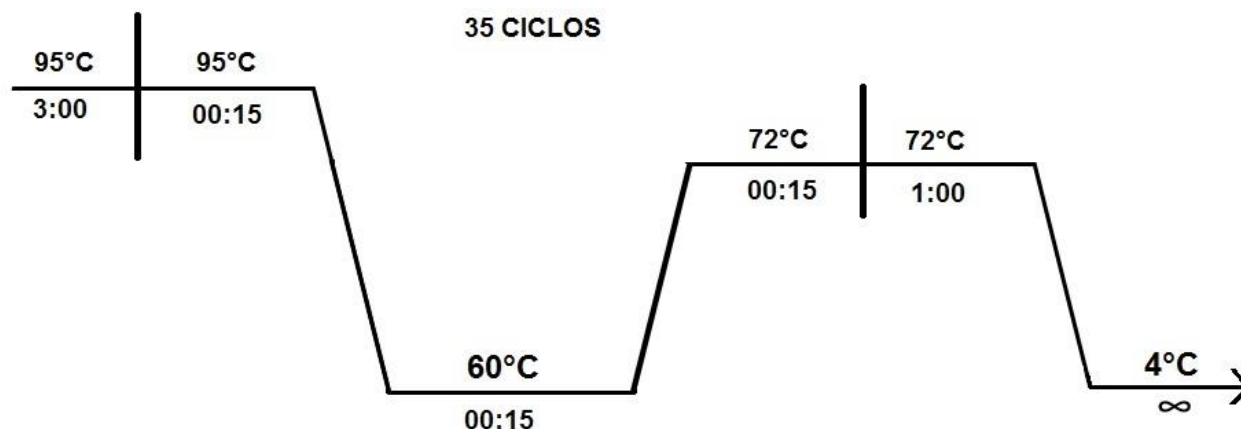


Figura 6. Condiciones de tiempo y temperatura para la PCR para *TORIA*.

E. Secuenciación de los productos de PCR

Posterior al análisis de PCR, se verificó el amplicón por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% y se limpió la reacción por filtración en gel para eliminar ddNTPs no incorporados en la reacción. Para la secuenciación del fragmento de DNA amplificado se usó el reactivo *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* siguiendo el programa de la figura 7, se limpió con *DNA Sequencing Clean-up Kit™ (Zymo Research)*, al término la reacción se secó al vacío a temperatura ambiente, en un equipo SpeedVac (Eppendorf).

La reacción de secuenciación se preparó según la Tabla 3, en un volumen de 10µL en microtubos de 200µL.

Tabla 3. Preparación de muestra de trabajo para reacción de secuenciación tipo Sanger de *TORIA*

Cantidad (µL)	Reactivo
1.0	Oligonucleótido (sentido o antisentido)
2.0	Amortiguador de secuenciación
1.0	Mezcla comercial de reacción de secuenciación
2.5	Amplicón purificado
3.5	Agua libre de nucleasas

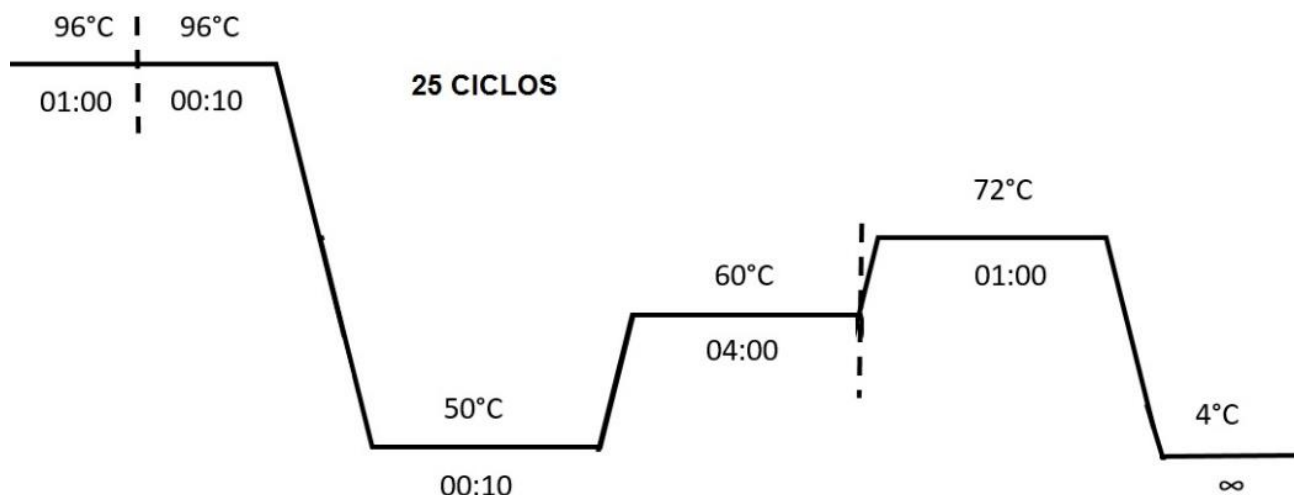


Figura 7. Condiciones de tiempo y temperatura para la reacción de secuenciación de *TORIA*

F. Método de análisis de resultados

Para el análisis de las secuencias, se usó como referencia la secuencia del NCBI del gen *TORIA* (Tabla 4).

El análisis bioinformático de las secuencias se realizó con los programas *Mutation Surveyor* (*SoftGenetics*), *Sequencing analysis v5.2* (AB), *Sequencher® v5.1* (*Gene Codes*), *BioEdit 7.2* y *GeneStudio* y se compararon con las reportadas en bases de datos públicas tales como Ensembl, VARSOME, ClinVar y dbSNP, *Mastermind*.

Para las variantes nuevas se hizo una predicción *in silico* de sus posibles efectos en la proteína con las herramientas: *Human Splicing Finder (HSF)*, *ESEfinder*, *Rebase* y *PolyPhen*.

Tabla 4. Secuencia de los exones de gen *TORIA* (tomado de *Ensembl*, transcrito ENST00000351698.5)

EXÓN	SECUENCIA	Número
1	ACCGGTTTCGCGGTCGGCGCGAGAACAAGCAGGGTGGCGCGG	
	GTCCGGGCATGAAGCTGGGCCGGGCCGTGCTGGGCCTGCTG	60
	CTGCTGGCGCCGTCCGTGGTGCAGGCGGTGGAGCCCATCAG	120
	CCTGGGACTGGCCCTGGCCGGCGTCTCACCGGCTACATCTA	180
	CCCGCGTCTCTACTGCCTCTTCGCCGAGTGCTGCGGGCAGAA	228
	GCGGAGCCTTAGCCGGGAGG	
2	CACTGCAGAAGGATCTGGACGACAACCTCTTTGGACAGCAT	240
	CTTGCAAAGAAAATCATCTTAAATGCCGTGTTTGGTTTCATA	300
	AACAACCCAAAGCCCAAGAAACCTCTCACGCTCTCCCTGCA	360
	CGGGTGGACAGGCACCGGCAAAAATTCGTCAGCAAGATCA	420
	TCGCAGAGAATATTTACGAGGGTGGTCTGAACAGTACTAT	480
		493

	GTCCACCTGTTTGTGGCCACATTGCACTTTCCACATGCTTCA	
	AACATCACCTTGTACAA	
	GGATCAGTTACAGTTGTGGATTCGAGGCAACGTGAGTGCCT	540
	GTGCGAGGTCCATCTTCATATTTGATGAAATGGATAAGATGC	600
3	ATGCAGGCCTCATAGATGCCATCAAGCCTTTCCTCGACTATT	660
	ATGACCTGGTGGATGGGGTCTCCTACCAGAAAGCCATGTTT	668
	ATATTTCTCAG	
	CAATGCTGGAGCAGAAAGGATCACAGATGTGGCTTTGGATT	720
4	TCTGGAGGAGTGGAAAGCAGAGGGAAGACATCAAGCTCAA	780
	AGACATTGAACACGCGTTGTCTGTGTGTCGGTTTTCAATAACAA	796
	GAACA	
	GTGGCTTCTGGCACAGCAGCTTAATTGACCGGAACCTCATTG	
	ATTATTTTGTTCCTTCCCTCCCCTGGAATACAAACACCTAA	840
	AAATGTGTATCCGAGTGGAAATGCAGTCCCGAGGCTATGAA	900
5	ATTGATGAAGACATTGTAAGCAGAGTGGCTGAGGAGATGAC	960
	ATTTTTCCCAAAGAGGAGAGAGTTTTCTCAGATAAAGGCTG	1020
	CAAAACGGTGTTCACCAAGTTAGATTATTACTACGATGATTG	1079
	ACAGTCATGATTGGCAGCCGGAGTCACTGCCTG	

VII. Resultados

A. Análisis cualitativo del DNA

El DNA de las muestras incluidas fue de alto peso molecular e íntegro (Fig. 8).

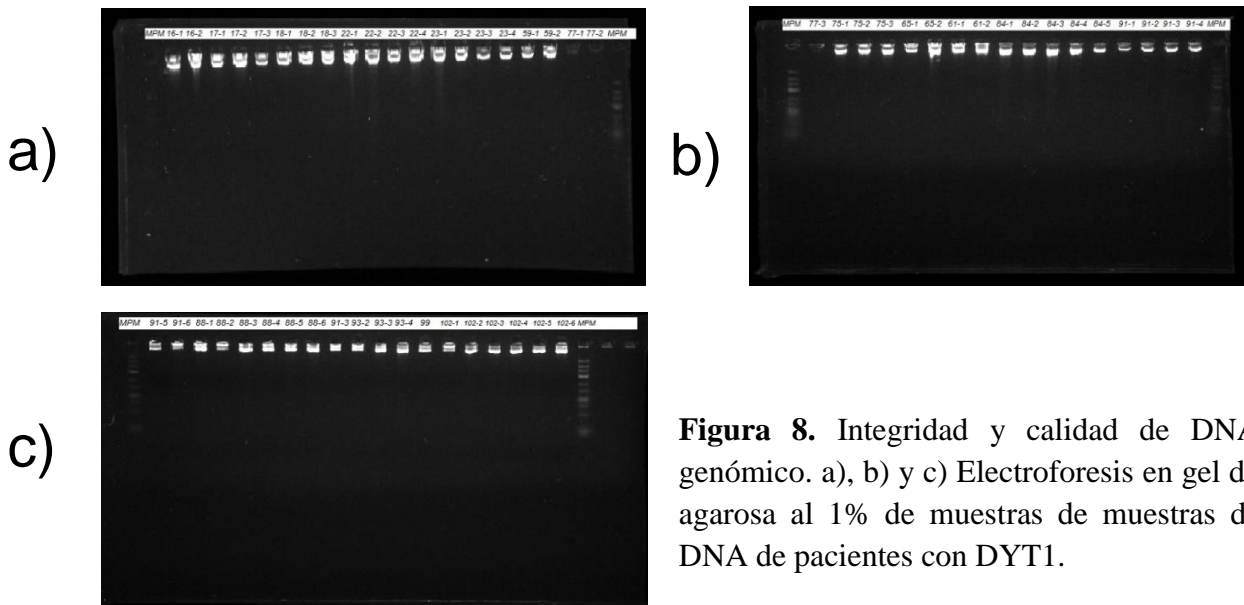


Figura 8. Integridad y calidad de DNA genómico. a), b) y c) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de muestras de muestras de DNA de pacientes con DYT1.

B. Análisis cuantitativo del DNA

La cuantificación de las muestras de DNA se realizó por espectrofotometría en un equipo NanoDrop (ThermoFisher). Las muestras cumplieron con los estándares de concentración (>100ng/ μ L) y los rangos de pureza con lecturas a las siguientes longitudes de onda (nm) y calculando los factores: 260/280 =1.8-2.0 para evitar contaminación por proteínas y 260/230 =2.0 para lecturas de sales y carbohidratos.

C. Estandarización de PCR

La estandarización de PCR se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones de volumen de la tabla 5.

Tabla 5. Volúmenes finales de reactivos para PCR de los exones y promotor de *TORIA*

REACTIVO	Prom. 140 (μ L)	Prom. 297 (μ L)	Exón 2 (μ L)	Exón 3-4 (μ L)	Exón 5 (μ L)	Exón 5 (μ L)
DNA (50ng/ μ L)	1.0	0.5	0.5	0.5	0.8	0.8
Oligo F (10 μ M)	0.35	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Oligo R (10 μ M)	0.35	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Mezcla de reacción	10.5	11.0	11.0	11.0	10.5	10.5
DMSO	0.1	-	-	-	-	-
Agua libre de nucleasas	7.6	7.7	7.7	7.7	7.9	7.9

*Prom., secuencia del promotor de *TORIA*. DMSO: dimetilsufóxido como co-solvente.

Se obtuvieron los amplicones específicos de *TORIA* (Fig. 9).

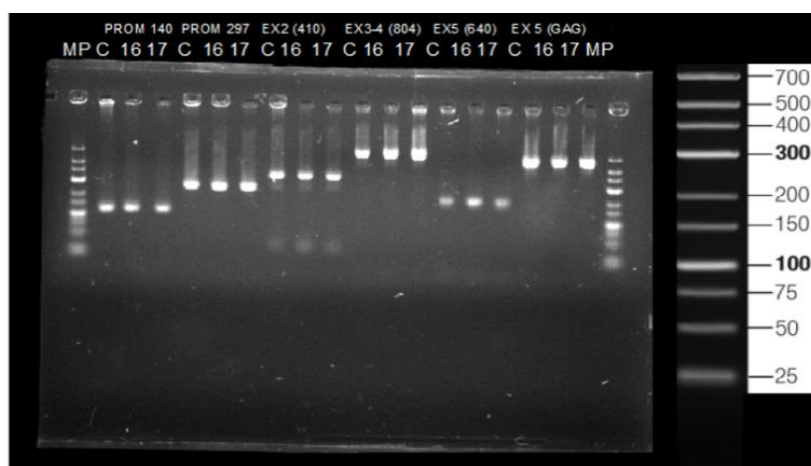


Figura 9. Imagen representativa de los productos de PCR de los diferentes exones y promotor de *TORIA*. MP: marcador de peso molecular (guía de tamaños en pares de bases a la derecha). C: control; 16, 17: número de muestra. PROM, promotor. Ex, exón. Tamaño de cada amplicón en pares de bases entre paréntesis.

D. Amplificación de sondas dependientes de ligando (MLPA)

Los resultados de MLPA en los pacientes estudiados, se resumen en la Tabla 6, así mismo la Figura 10 compara el resultado de MLPA en un paciente con la delección del trinucleótido GAG y un control sano.

Tabla 6. Resultados de MLPA en pacientes con probable distonía tipo 1

MUESTRA	RESULTADO	MUESTRA	RESULTADO
16	Normal	77	Normal
17	(+) para GAGdel	82	Normal
18	Normal	83	-----
21	Normal	84	(+) para GAGdel
22	Normal	88	Normal
23	Normal	91	Normal
28	Normal	93	Normal
50	Normal	99	(+) para GAGdel
59	Normal	102	Normal
61	Normal	107	Normal
65	Normal	111	Normal
75	Normal		

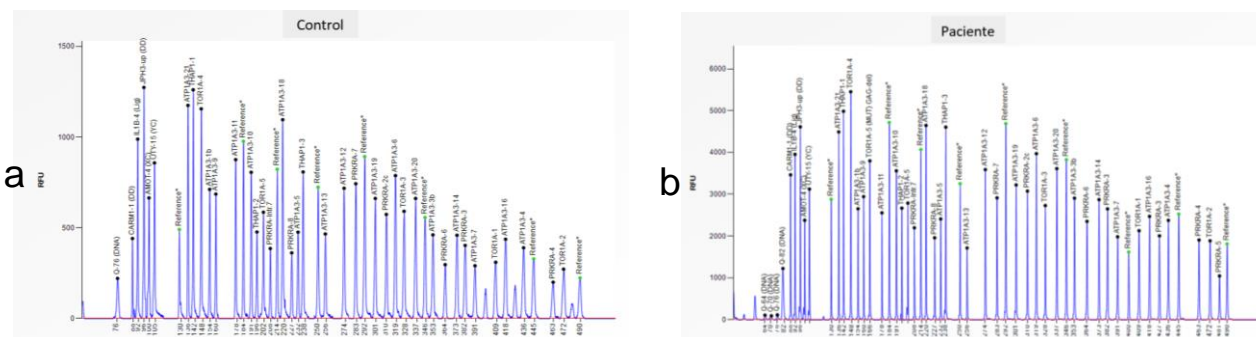


Figura 10. Imágenes representativas del MLPA de un control (a) y un paciente con la delección GAG en el exón 5 *TOR1A* (166pb) (b).

E. Secuenciación tipo Sanger

La Tabla 7 muestra todas las variantes genéticas identificadas en el gen *TORIA* mediante secuenciación.

Tabla 7. Variantes genéticas de *TORIA* identificadas durante el análisis bioinformático.

MUESTRA	Promotor (297pb) (Exón 1)	Exón 2	Exón 3-4	Exón 5
16	rs758157379 p.Leu42=	(-)		(-)
17	(-)	(-)		rs80358233 p.Glu303del
18		(-)		(-)
21	rs758157379 p.Leu42=	(-)		(-)
22	rs758157379 p.Leu42=	c.275C>T * p.Ala75Val		(-)
23	rs758157379 p.Leu42=	(-)		(-)
28	(-)	rs2296793 p.Ala82=		(-)
50	(-)	(-)	c.518G>C* p.Arg156Pro	(-)
59	(-)	rs2296793 p.Ala82=		(-)
61	(-)	rs2296793 p.Ala82=	c.518G>C* p.Arg156Pro	(-)
65	(-)	rs2296793 p.Ala82=		(-)
75	(-)	(-)		(-)
77	(-)	rs2296793 p.Ala82=		(-)
82	(-)	rs2296793 p.Ala82=		(-)
83				
84	(-)	(-)		rs80358233 p.Glu303del

88	(-)	(-)	(-)
91	(-)	rs1243026347 p.Leu65=	(-)
93	(-)	(-)	(-)
99	(-)	(-)	rs80358233 p.Glu303del
102	(-)	c.303T>G* p.F84L	(-)
107	(-)	(-)	(-)
111	(-)	(-)	(-)

*No reportadas; variantes en color verde: benignas; amarillo: probablemente dañinas; y rojo: dañinas.

Las Figuras 11 y 12 muestran un fragmento de la secuencia del exón 5 del gen *TORIA*, donde se puede observar la delección del residuo de ácido glutámico en fase.

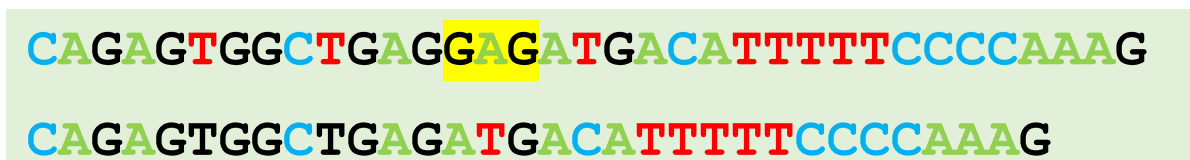


Figura 11. Fragmento de secuencia del exón 5 del gen *TORIA*, delección del triplete GAG (resaltado en amarillo). Debido a que esta delección elimina uno de los dos ácidos glutámicos contiguos en la secuencia del gen, también se le conoce como del E302/303.

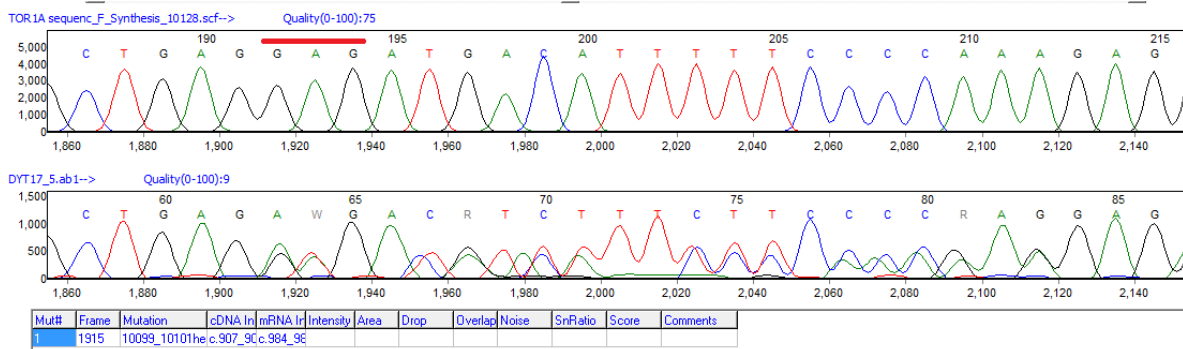


Figura 12. Electroferograma con la secuencia parcial del exón 5 *TORIA* en un paciente que presenta delección heterocigota del triplete GAG (marcado en rojo). Panel superior corresponde a un control, y el panel inferior al paciente.

VIII. Discusión de resultados

En este estudio se analizó la dosis de cuatro genes (*TORIA*, *THAPI*, *ATPIA3* y *PRKRA*) y la secuencia de *TORIA* en 23 pacientes con probable DYT1 o distonía generalizada de inicio temprano.

De acuerdo con Dobričić et al. (2015), las variantes causales de DYT1 no solo se deben a la variante c.904_906delGAG, por ello se recomienda caracterizar los 5 exones que componen *TORIA*, en ese estudio se caracterizaron variantes *de novo* probablemente patogénicas en un caso familiar.

El MLPA evidenció la delección GAG en tres pacientes, con esta técnica determinamos la dosis de todos los exones de *TORIA*, y de otros genes asociados a distonías que están presentes en el panel, y observamos que no hubo alteraciones estructurales en ninguno de los genes. Este resultado concuerda con lo descrito en la literatura, donde sólo hay dos casos con grandes deleciones que incluyen a *TORIA* (Campbell et al. 2012). Por lo que, las alteraciones estructurales en los genes *TORIA*, *THAPI*, *ATPIA3* y *PRKRA* son raras en pacientes MM con probable DYT1.

La secuenciación de *TORIA* identificó dos variantes nuevas probablemente dañinas, una de ellas localizada en el exón 2 (p.Ala75Val) y una en el exón 3 (c.518G>C, p.Arg156Pro) (Anexo 4) que de acuerdo a la predicción *in silico* con la herramienta *PolyPhen* involucran cambio de aminoácido y se sugieren probablemente dañinas. Los cambios de aminoácidos en estas variantes afectan el dominio de torsina 1A interacciona con la proteína esnapina por lo que la pérdida de función de alguna de ellas afectará a ambas proteínas, afectando la captación neuronal de neurotransmisores como la dopamina, que desempeña un papel en el desarrollo de movimientos distónicos (Granata et. al. 2007). Los residuos afectados en las dos variantes nuevas están altamente conservados en distintas especies animales, apoyando la patogenicidad de las variantes descritas.

Adicionalmente, se hallaron variantes sinónimas benignas ya reportadas y una variante nueva (c.303T>G, p.F84L), la predicción *in silico* de esta última se sugiere benigna con las herramientas *Polyphen* y *Human Splicing Finder*.

Los 17 pacientes con diagnóstico clínico probable de DYT1 no presentaron variantes dañinas en el gen *TORIA* lo que sugiere la participación de otros genes implicados en DYT1. De acuerdo con Schneider y cols. (2011) puede haber alteraciones en el gen *THAPI* que podrían explicar este cuadro clínico.

A pesar de que la variante más común en DYT1 sigue siendo GAGdel, en este trabajo identificamos 2 variantes adicionales; por lo que nuestros resultados, al igual que en otros reportes confirman que es necesario secuenciar el gen completo para tener un diagnóstico de certeza.

IX. Conclusiones

Este es el primer estudio molecular de pacientes MM con diagnóstico clínico de DYT1. Se identificaron seis casos con 3 variantes alélicas de *TOR1A* que explican el cuadro clínico de DYT1 en 26.08% de casos en esta muestra.

La frecuencia de la variante GAGdel, rs80358233 en *TOR1A* en pacientes MM con DYT1 es baja en la muestra estudiada (3/23= 13.04%), en comparación con lo reportado en la literatura de 80% en judíos Ashkenazi (Dobričić, 2015). Sin embargo, la frecuencia de variantes en *TOR1A* en pacientes MM con DYT1 está dentro de los rangos (6/23= 26.08%), en comparación con lo descrito en la literatura para otras poblaciones, por ejemplo, en población brasileña es de 31.81% (Camargo, 2014).

Nuestros resultados sugieren la participación de otros genes *DYT* asociados a este fenotipo, ya que 17 casos no mostraron alteración en *TOR1A*.

X. Referencias bibliográficas

1. Fuchs, T., Saunders, R., Masuho, I., Luciano, M., Raymond, D., Factor, S., Ozelius, L. (2012). Mutations in GNAL cause primary torsion dystonia. *Nature Genetics*. 45(1), 88–92.
2. GeneReviews (2016). DYT1 Early-Onset Isolated. *Dystonia*. Consultado en marzo de 2019. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1492/>
3. Charlesworth, G., Angelova, P., Bartolomé, F., Ryten, M., Trabzuni, D., Stamelou, M., Wood, N. (2015). Mutations in HPCA Cause Autosomal-Recessive Primary Isolated Dystonia. *The American Journal of Human Genetics*. 96(4), 657–665.
4. Albanese, A., Bhatia, K., Bressman, S., DeLong, M., Fahn, S., Fung, V. Teller, J. (2013). Phenomenology and classification of dystonia: A consensus update. *Movement Disorders*, 28(7), 863–873.
5. De Carvalho Aguiar, P., Ozelius, L. (2002). Classification and genetics of dystonia. *The Lancet Neurology*, 1(5), 316–325.
6. Siokas, V., Aloizou, AM., Tsouris, Z., Michalopoulou, A., Mentis, AA, Dardiotis, E. (2019). Risk Factor Genes in Patients with Dystonia: A Comprehensive Review. *Tremor Other Hyperkinet Mov*. 8, 559.
7. Mitchell, S., Iwabuchi, S., Kawano, H., Yuen, T., Koh, J., Ho, K., (2018) Structure of the Golgi apparatus is not influenced by a GAG deletion mutation in the dystonia-associated gene Tor1a. *PLoS ONE* 13(11), 1-36.
8. The human gene mutation database (HGMD). Gene TOR1A. Consultado en febrero 2019. Disponible en: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=TOR1A>
9. Beauvais, G., Rodriguez-Losada, N., Ying, L., Zakirova, Z., Watson, J. L., Readhead, B., Gonzalez, P. (2018). Exploring the Interaction Between eIF2 α Dysregulation,

- Acute Endoplasmic Reticulum Stress and DYT1 Dystonia in the Mammalian Brain. *Neuroscience*. 371, 455–468.
10. Kaiser, F., Osmanovic, A., Rakovic, A., Erogullari, A., Uflacker, N., Braunholz, D., Lohmann, K. (2010). The dystonia gene DYT1 is repressed by the transcription factor THAP1 (DYT6). *Annals of Neurology*. 68(4), 554–559.
 11. Zakirova, Z., Fanutza, T., Bonet, J., Readhead, B., Zhang, W., Yi, Z., Ehrlich, M. E. (2018). Mutations in THAP1/DYT6 reveal that diverse dystonia genes disrupt similar neuronal pathways and functions. *PLOS Genetics*. 14(1), 1-25.
 12. Dobričić, V., Kresojević, N., Žarković, M., Tomić, A., Marjanović, A., Westenberger, A., Kostić, V. S. (2015). Phenotype of non-c.907_909delGAG mutations in TOR1A: DYT1 dystonia revisited. *Parkinsonism & Related Disorder*. 21(10), 1256–1259.
 13. UNIPROT. Torsin-1A. Consultado el 21 de noviembre de 2019. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprot/O14656>
 14. Campbell, I., Yatsenko, A., Hixson, P., Reimschisel, T., Thomas, M., Wilson, W., Scaglia, F. (2012). Novel 9q34.11 gene deletions encompassing combinations of four Mendelian disease genes: STXBP1, SPTAN1, ENG and TOR1A. *Genetics in Medicine*, 14(10), 868–876.
 15. MRC Holland. (2019). Protocolo general de MLPA: Instrucciones de uso. Consultado el 25 de Noviembre de 2019. Disponible en: http://www.mlpa.com/webforms/webformdbdata.aspx?Tag=_hs-avfinwhn-zjptfsyexctt1_inkzywnpht61rj0ufxqlbmhvab2ttoumzdt9y4gt8e89eboi.
 16. MRC Holland. (2018). Product Description SALSA® MLPA® Probemix P059-B2 Dystonia. Consultado el 25 de Noviembre de 2019. Disponible en: http://mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?FileOID=_wEAW-OAunaY.
 17. Greif G. (s.f.). Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos. Consultado el 25 de noviembre de 2019. Disponible en: http://www.chlaep.org.uy/descargas/curso_tb_mico_bacterias/metodos_de_secuenciacion_de_acidos_nucleicos.pdf
 18. De Necochea R., Canul J. (2004). Proyecto de investigación: Secuenciación de ácidos nucleicos. Consultado el 25 de noviembre de 2019. Disponible en: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_acidos_nucleicos.pdf
 19. Schneider, S., Ramirez, A., Shafiee, K., Kaiser, F., Erogullari, A., Brüggemann, N., Lohmann, K. (2011). Homozygous THAP1 mutations as cause of early-onset generalized dystonia. *Movement Disorders*, 26(5), 858–861.
 20. Granata, A., Watson, R., Collinson, L. M., Schiavo, G., & Warner, T. T. (2007). The Dystonia-associated Protein TorsinA Modulates Synaptic Vesicle Recycling. *Journal of Biological Chemistry*, 283(12), 7568–7579.
 21. Camargo, C., Camargos, S., Raskin, S., Cardoso, F., Teive, H. A. G. (2014). Genetic evaluation for TOR1-A (DYT1) in Brazilian patients with dystonia. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 72(10), 753–756.

22. Aitken A. (comunicación personal) (2012). TE buffer (Tris-EDTA buffer). Consultado el 01 de Marzo del 2019. Disponible en: <https://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/te-buffer.pdf>
23. Brody JR, Kern SE. (2004). Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques*, 36(2):214-6.

XI. Anexos

A. ANEXO 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



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

B. ANEXO 2

Amortiguador SB (20X)

Amortiguador de borato de sodio (NaOH 200 mM, pH-8.2)

El amortiguador SB permite que los geles de agarosa se ejecuten a un voltaje más alto, por lo tanto, la separación del DNA es más rápida.

Componentes	Cantidad (g)
NaOH	8
H ₃ BO ₃	47
Agua	c.b.p.

Asegúrese de que se disuelvan completamente. Use una membrana de filtro de 0.2 µm para filtrar. El pH se puede ajustar a 8 con HCl o NaOH, según sea el caso (Brody, 2004).

C. ANEXO 3.

Amortiguador TE

El amortiguador TE está compuesto por Tris-HCl que otorga el pH de 8.0 – 8.3 y EDTA como agente quelante del ión Mg²⁺ que es cofactor de nucleasas, por tanto protege el DNA de la degradación.

El pH debe ser de 8.0–8.3 ya que favorece la inactivación de las nucleasas.

Componentes	Concentración final
Tris pH: 8	10 mM
EDTA pH: 8	1 mM
Agua	c.b.p.

El pH se puede ajustar a 8 con HCl o NaOH según el caso (Aitken, 2012).

D. ANEXO 4

Electroferogramas de secuenciación de variantes posiblemente dañinas

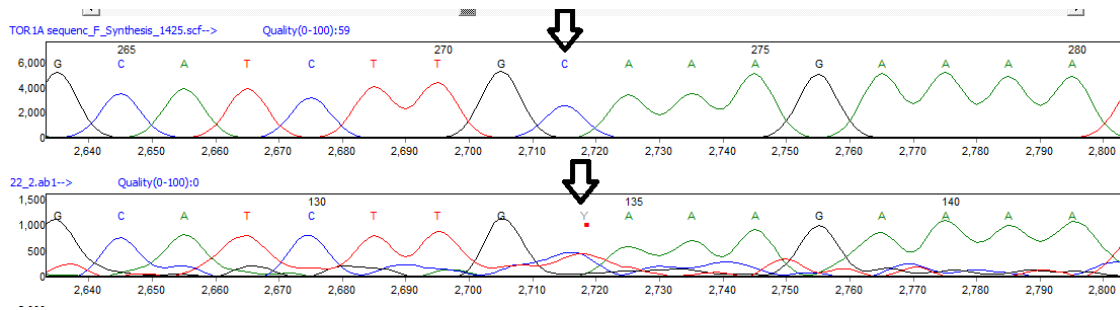


Figura 1. Electroferograma con la secuencia parcial del exón 2_*TOR1A* en un paciente que presenta variante nueva c.275C>T, p.Ala75Val (marcado con flecha negra). Panel superior corresponde a un control, y el panel inferior al paciente.

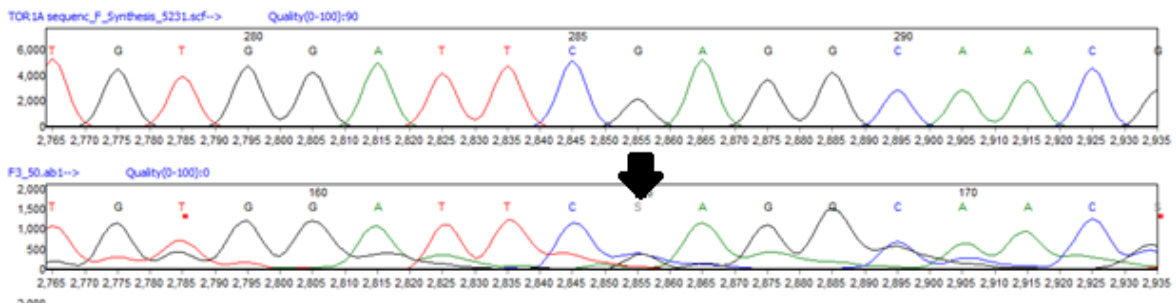


Figura 2. Electroferograma con la secuencia parcial del exón 3_*TOR1A* en un paciente que presenta variante nueva c.518G>C, p.Arg156Pro (marcado con flecha negra). Panel superior corresponde a un control, y el panel inferior al paciente.

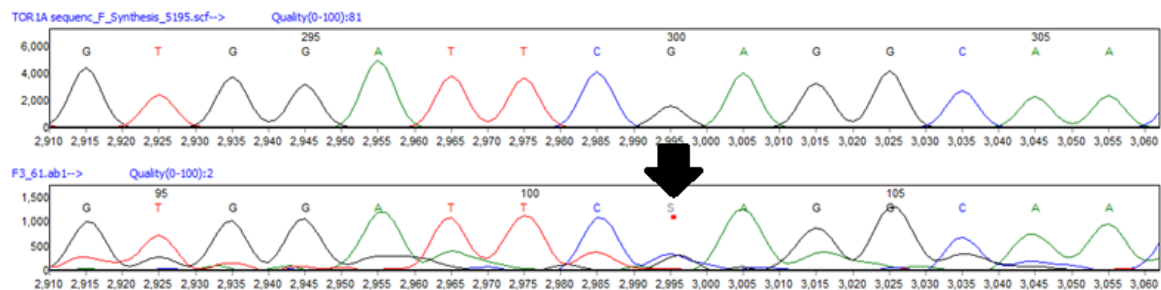


Figura 3. Electroferograma con la secuencia parcial del exón 3_*TOR1A* en un paciente que presenta variante nueva c.518G>C, p.Arg156Pro (marcado con flecha negra). Panel superior corresponde a un control, y el panel inferior al paciente.

Vo. Bo. Del contenido académico



Dr. Alberto Ortega Vázquez
Profesor asociado "D" TC
No. E: 35583



Dra. Nancy Monroy Jaramillo
Investigador en Ciencias Médicas D
Departamento de Genética, INNNMVS
No. Cédula profesional: 09136591