



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Reporte de Servicio Social

EVALUACIÓN DE LA METILACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN *TOR1A*

Alitzel Rodríguez Gutiérrez
Matricula: 2183027216

Fecha: 15 de marzo de 2024.

Vo. Bo.

Asesor Interno
Dra. Marisol López López
7808

Departamento de Sistemas Biológicos
UAM Xochimilco

Asesor Externo
Dra. Nancy Monroy Jaramillo
09136591

Departamento de Genética
INNNMVS

Contenido

I.	Datos Generales.....	3
II.	Introducción	4
III.	Justificación	5
IV.	Objetivos.....	6
A.	Objetivo General	6
B.	Objetivos específicos.....	6
V.	Marco teórico	6
A.	DYT-TOR1A.....	6
B.	Gen TOR1A	7
C.	Proteína Torsina 1A	7
D.	Variante TOR1A_rs1801968	8
E.	Mecanismos epigenéticos	9
1.	Metilación	10
F.	Análisis molecular	11
1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	11
2.	qPCR y Discriminación Alélica.....	12
a)	Gráficos de discriminación alélica	13
3.	Secuenciación de Sanger	14
a)	Electroforesis capilar	15
4.	Análisis de metilación del ADN	16
a)	Tratamiento del ADN con bisulfito de sodio.....	16
b)	Pirosecuenciación.....	16
VI.	Metodología	19
A.	Sujetos.....	20
1.	Criterios de selección de pacientes y familiares	20
2.	Criterios de selección de controles	20
B.	Toma de muestra biológica	20
1.	Sangre periférica	20
2.	Saliva	21
3.	Trabajo de campo.....	21
C.	Extracción de ADN genómico	21

1.	Sangre periférica	21
2.	Saliva	22
3.	Manejo de desechos biológicos.....	22
4.	Análisis cuantitativo del ADN genómico	22
5.	Análisis cualitativo del ADN genómico.....	23
D.	Genotipificación de la variante <i>TOR1A_rs1801968</i>	23
E.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del exón 5 de <i>TOR1A</i>	24
F.	Secuenciación del exón 5 de <i>TOR1A</i>	25
G.	Determinación de la segregación en <i>cis</i> o <i>trans</i> de las variantes D216H y delGAG.....	26
H.	Análisis de metilación.....	26
a)	Diseño de sonda y oligonucleótidos.....	26
b)	Conversión del ADN con bisulfito de sodio	27
c)	Reacción en cadena de la polimerasa	27
d)	Pirosecuenciación.....	28
I.	Análisis estadístico	28
VII.	Resultados	28
1.	Descripción de la muestra	28
2.	Identificación de la variante <i>TOR1A_rs1801968</i>	29
3.	Secuenciación del exón 5 de <i>TOR1A</i>	30
4.	Determinación de la fase de la segregación en <i>cis</i> o <i>trans</i> de dos variantes en <i>TOR1A</i> ..	31
5.	Análisis de metilación de la región promotora del gen <i>TOR1A</i>	33
6.	Análisis de resultados	37
7.	Conclusiones	38
VIII.	Referencias bibliográficas.....	39
IX.	Anexos	44
A.	Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado.....	44
B.	Anexo 2. Unified Dystonia Rating Scale (UDRS).	53

I. Datos Generales

Lugar de realización

Laboratorio de Genética Molecular N-103, UAM-Xochimilco y Departamento de Genética, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNNMVS).

Periodo de realización

Del 25 de noviembre de 2022 al 26 de mayo de 2023.

Protocolo de participación

“Niveles de metilación de las regiones promotoras de los genes *TOR1A* y *THAP1* en pacientes mexicanos con distonía”, (protocolo INNN_161/22).

Lugar de procedencia

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura

Química Farmacéutica Biológica

Asesores

Asesor Interno: Dra. Marisol López López

Asesor Externo: Dra. Nancy Monroy Jaramillo

II. Introducción

La distonía es un trastorno del movimiento caracterizado por contracciones musculares sostenidas involuntarias, lo que provoca torsiones, movimientos y posturas anormales repetitivas (Albanese *et al.*, 2013). Los síntomas pueden diferir significativamente en severidad y pueden localizarse en segmentos restringidos (formas focales, como blefaroespasma y calambre del escritor) o en todo el cuerpo (formas generalizadas) (Sciamanna *et al.*, 2022).

Existen diversas clasificaciones para la distonía. En 2013 un consenso de expertos describió una clasificación denominada como la Escala Unificada de Calificación de Distonía (*Unified Dystonia Rating Scale, UDRS*), la cual fue diseñada para incluir una evaluación más detallada de la gravedad de la distonía en áreas individuales del cuerpo (Movement disorders, 2022). Dicha escala tiene un enfoque en dos ejes principales, el eje 1 para las características clínicas (edad de inicio, distribución corporal, temporalidad y características asociadas), mientras que el eje 2 es para la posible etiología (patología del sistema nervioso, genética o adquirida) (Albanese *et al.*, 2013).

La DYT-TOR1A es una distonía generalizada de inicio temprano, que corresponde a una forma autosómica dominante, y la mayoría de los casos es causada por una delección del triplete GAG en el exón 5 del gen TOR1A (c.907_909del:p.303_303del) (Ozelius *et al.*, 2011). Se estima que la prevalencia de esta variante patogénica es de 17,6 a 26,1 portadores por cada 100,000 personas y muestra una penetrancia clínica reducida, cercana al 30%; lo que permite que los pacientes muestren una gran variedad de manifestaciones clínicas (Park *et al.* 2019).

Uno de los factores identificados que tienen influencia sobre la penetrancia reducida ha sido la variante TOR1A_rs1801968, (Risch *et al.*, 2007); sin embargo, esta no responde por completo a la penetrancia reducida, por lo que mecanismos epigenéticos, encargados de la regulación de la expresión génica, pueden funcionar como explicación de la penetrancia reducida presente en esta patología (Sciamanna *et al.*, 2022).

El potencial de los mecanismos epigenéticos ha sido poco investigado en la distonía; sin embargo, el nivel de metilación de los dinucleótidos CpG en la región promotora del gen *TOR1A* podría ser un buen candidato para la explicación de la baja penetrancia presente en la distonía y la variabilidad de manifestaciones clínicas de esta (Hamid *et al.*, 2020).

III. Justificación

La distonía por variantes patogénicas en el gen *TOR1A* es un trastorno hiperkinético de origen genético con baja frecuencia y del cual no existen estudios epidemiológicos precisos en México. Existe una amplia variabilidad entre las manifestaciones clínicas que presentan los pacientes afectados por distonía, encontrándose inclusive sujetos portadores de la variante patogénica que no presentan manifestaciones clínicas. La explicación de esta variabilidad es la penetrancia cercana al 30% presente en este tipo de distonía; por lo que se han evaluado diversos fenómenos que puedan estar involucrados en ello.

Uno de los factores identificados que influye sobre la penetrancia reducida ha sido la variante *TOR1A_rs1801968* (D216H) y su segregación en cis/trans respecto a la variante patogénica delGAG, donde el alelo H en trans suele ser un factor protector contra la distonía, mientras que el alelo D en cis se asocia con la penetrancia en la enfermedad. Sin embargo, este ha demostrado no ser el único responsable; por lo que es necesario estudiar otro tipo de fenómenos o mecanismos que permitan establecer una relación estrecha.

Los mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN y las modificaciones de la cola de las histonas, modulan la expresión génica sin realizar cambios en la secuencia del ADN. Estos mecanismos podrían explicar la penetrancia incompleta en la distonía; por ello, se propone evaluar el porcentaje de metilación en el promotor del gen *TOR1A* en pacientes afectados por distonía (portadores de delGAG) y controles pareados por edad y sexo; lo que ayudaría a entender más sobre las implicaciones clínicas en pacientes asintomáticos.

IV. Objetivos

A. Objetivo general

Analizar el nivel de metilación de la región promotora del gen *TOR1A*.

B. Objetivos específicos

- Cuantificar el nivel de metilación de la región promotora del gen *TOR1A* en individuos control, pacientes con distonía y familiares.
- Genotipado de la variante *TOR1A_rs1801968* en pacientes, familiares e individuos control.
- Identificar familiares portadores de la variante patogénica causante de DYT-*TOR1A*.

V. Marco teórico

A. DYT-*TOR1A*

La DYT-*TOR1A* (MIM #128100) corresponde a una forma autosómica dominante y es causada por una delección del triplete GAG en el exón 5 del gen *TOR1A* (delGAG. c.907_909del:p.303_303del) (Ozelius *et al.*, 2011). Dicha delección resulta en la pérdida de uno de los pares de residuos de ácido glutámico en el dominio C terminal de la proteína de unión a ATP, Torsina A, para la cual codifica el gen *TOR1A* (Ozelius *et al.*, 1997). Se estima que la prevalencia de esta variante patogénica es de 17,6 a 26,1 portadores por cada 100, 000 personas (Park *et al.* 2019). Muestra una penetrancia clínica reducida, cercana al 30%; por lo que, los pacientes afectados por la variante patogénica del gen *TOR1A* muestren una gran variedad de manifestaciones clínicas (Park *et al.* 2019).

Las principales características de la DYT-*TOR1A* son los movimientos de torsión involuntarios y los trastornos del movimiento que comienzan en la infancia, generalmente comienzan en las extremidades y se extienden gradualmente a los músculos del cuello y la cara, y progresan a una distonía generalizada grave. Estos movimientos involuntarios pueden afectar significativamente la vida diaria y la

movilidad, lo que conduce a la rigidez y discapacidad de las extremidades del paciente (Albanese *et al.*, 2013).

La historia natural de la distonía DYT-*TOR1A* sugiere un período de vulnerabilidad, ya que el inicio ocurre en la infancia, y los portadores de la variante patogénica que son asintomáticos en los primeros 20 años de vida a menudo permanecen asintomáticos durante toda la vida, lo que sugiere que hay otros factores que influyen en el desarrollo (Albanese *et al.*, 2011).

DYT-*TOR1A* es una enfermedad irreversible para la que actualmente no existe cura; el objetivo del tratamiento es aliviar los síntomas, reducir las molestias y mejorar la calidad de vida de los pacientes; las opciones de tratamiento incluyen medicamentos, terapia con toxina botulínica, cirugía, fisioterapia, entre otros tratamientos emergentes (Fan *et al.*, 2023).

B. Gen *TOR1A*

El gen *TOR1A* (*Torsin family 1 member A*) anteriormente conocido como *DYT1*; cubre una región de 11k pb, consta de 5 exones y se localiza en la región 9q34.11 (Hettich *et al.*, 2014).

La proteína codificada por este gen es la proteína torsina A que es miembro de la familia AAA+ de las adenosinas trifosfatasas (ATPasas), y se expresa de forma prominente en la sustancia negra *pars compacta* (NCBI, 2024).

Las mutaciones en este gen dan lugar al trastorno autosómico dominante, conocido como distonía de torsión 1 o DYT-*TOR1A*, como es el caso de la delección del triplete GAG en el exón 5 del gen (p.303_303del) (Ozelius *et al.*, 2011).

C. Proteína Torsina 1A

La proteína torsina A, pertenece a la familia de las ATPasas AAA+ que se pueden encontrar en el retículo endoplásmico y la envoltura nuclear de la mayoría de las células (Hettich *et al.*, 2014), incluidas las células del sistema nervioso central (Charlesworth, *et al.*, 2013) y están asociadas con una variedad de actividades celulares (Ozelius *et al.*, 1997).

La función de torsina A y cómo las mutaciones del gen *TOR1A* conducen a la distonía son poco conocidas (Charlesworth, *et al.*, 2013). Sin embargo, la proteína Torsina A está implicada en varios procedimientos moleculares y celulares, como las interacciones entre el citoesqueleto y la membrana, funciones importantes del retículo endoplásmico (reacción al estrés, vía secretora, degradación de proteínas, expansión de las neuritas) y de la envoltura nuclear (formación de membranas y migración celular) (Hettich *et al.*, 2014).

D. Variante *TOR1A*_rs1801968

Además de la variante patogénica (p.303_303del) en el gen *TOR1A* hay una variante de un solo nucleótido (SNV) (rs1801968; NM_000113.3:c.646G>C) en la secuencia codificante; que en el residuo 216 codifica para ácido aspártico (D) en el 88% de los alelos de la población e histidina (H) en el 12% (Ozelius *et al.*, 1997).

La importancia funcional de este SNV se ha demostrado en cultivos celulares; en donde las células que sobre expresan la proteína torsina A con el alelo H desarrollaron inclusiones similares a las observadas en las células que sobre expresan a la proteína torsina A resultante de la variante patogénica (p.303_303del) (Kock *et al.*, 2006).

Estos hallazgos sugieren que la variante D216H podría influir en la susceptibilidad a la distonía; y también como una variante potencialmente modificadora de la penetrancia en DYT-*TOR1A* (Ozelius *et al.*, 2011).

Cuando se examinó la relación de esta SNV con la penetrancia de la distonía DYT-*TOR1A*, se observó un aumento significativo en la frecuencia del alelo 216 H en los portadores asintomáticos de la delección GAG en relación con los portadores sintomáticos (Risch *et al.*, 2007). El análisis de haplotipos demostró un efecto altamente protector del alelo H cuando se encuentra en trans con la delección GAG (trans se refiere al hecho de que dos variantes genéticas se localizan en alelos diferentes); mientras que el alelo D216 en cis se asoció con la presencia de la distonía (Ozelius *et al.*, 2011).

Los hallazgos anteriores se confirmaron en un estudio donde se avala esta variante como un potente modificador intragénico (Kamm *et al.*, 2008); sin embargo, tiene un papel relativamente pequeño en la explicación de la penetrancia reducida porque el alelo H no es común (frecuencia de alrededor del 12%) en la población mundial (Ozelius *et al.*, 2011). En población mexicana este alelo tiene una frecuencia del 9.5 % (NCBI, 2023).

La confirmación funcional de esta asociación genética ha sido proporcionada por estudios de imagen que revelan que el metabolismo alterado observado en regiones cerebrales específicas en portadores asintomáticos de *DYT-TOR1A* está regulado por el SNV D216H (Carbon y Eidelberg, 2009).

E. Mecanismos epigenéticos

Debido a que la presencia de la variante D216H, no responde por completo la penetrancia reducida en esta condición también se tiene en sospecha la existencia de potenciales factores epigenéticos que modulan el desarrollo de la patología (Sciamanna *et al.*, 2022).

Los mecanismos epigenéticos han sido poco investigados en la distonía; sin embargo, el nivel de metilación de las regiones CpG en la región promotora del gen *TOR1A* podría ser un buen candidato para la explicación de la baja penetrancia presente en la distonía y la variabilidad clínica de esta (Hamid *et al.*, 2020).

Se ha demostrado el papel fundamental que juega la metilación del ADN en diferentes tipos de distonía como la distonía-parkinsonismo ligada al cromosoma X y la distonía mioclónica. En el caso de la distonía-parkinsonismo ligada al cromosoma X se ha informado sobre la presencia de una metilación del ADN alterada como mecanismo en la modulación de la expresión del gen *TAF1* (Krause *et al.*, 2020).

Además, en la distonía mioclónica, que es un síndrome caracterizado por mutaciones en el gen sarcoglicano épsilon (SGCE), se ha encontrado un mecanismo dependiente de una metilación diferencial del promotor del gen en las

neuronas diferenciadas a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) (Grütz *et al.*, 2017).

1. Metilación

Se ha demostrado que la metilación del ADN desempeña un papel importante en la regulación de muchos procesos biológicos esenciales, como la expresión génica, el desarrollo embrionario, la diferenciación celular y la impronta génica (Pajares *et al.*, 2021).

En los mamíferos, la metilación del ADN se caracteriza por la adición de un grupo metilo a la posición C₅ de la base de citosina de forma covalente; este proceso es catalizado por las metiltransferasas de ADN (DNMT) (Schubert, 2015).

En los seres humanos, la metilación se restringe a los residuos de citosina y se encuentra principalmente en los dinucleótidos de citosina-guanina (CG) (generalmente abreviados como "CpG") (Von Känel *et al.*, 2013). Las regiones con alto porcentaje de sitios de CpG se denominan islas de CpG; estas regiones se encuentran con frecuencia en los promotores de genes (Gardiner *et al.*, 1987). Alrededor del 40% de los genes humanos contiene una isla CpG en su región promotora, y su metilación suele asociarse con una expresión silenciada (Fatemi *et al.*, 2005).

La metilación del ADN cumple diferentes funciones en los seres humanos; entre ellas la regulación de genes específicos; por lo que, para mantener el correcto funcionamiento de los procesos celulares, la expresión génica debe estar estrictamente controlada (Smith *et al.*, 2013).

La presencia de grupos metilo en el promotor de un gen modifica la unión de ARN polimerasas, factores transcripcionales, y otras enzimas al ADN del gen (Pajares *et al.*, 2021). Así, las consecuencias biológicas de la metilación del ADN están determinadas no solo por su presencia en el genoma sino principalmente por su localización (Schubert, 2015).

Teniendo en cuenta su papel fundamental en la regulación de los genes y otros elementos genéticos, no es sorprendente que la metilación aberrante del ADN se asocie con varias enfermedades (Von Känel *et al.*, 2013).

F. Análisis molecular

1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es un proceso capaz de amplificar una sola molécula de ADN en millones de copias en poco tiempo; la amplificación se logra mediante una serie de tres pasos: **desnaturalización**, en la que por efecto del aumento de temperatura las plantillas de ADN de doble hebra se separan; **alineamiento**, en donde las moléculas de ADN llamadas cebadores u oligonucleótidos se unen a regiones flanqueantes del ADN objetivo; y **extensión**, donde la ADN polimerasa extiende el extremo 3' de cada cebador a lo largo de las hebras plantilla; estos pasos se repiten ("ciclan") entre 25 y 35 veces para producir exponencialmente copias exactas del ADN objetivo (**Figura 1**) (^aThermo Fisher Scientific Inc. 2024).

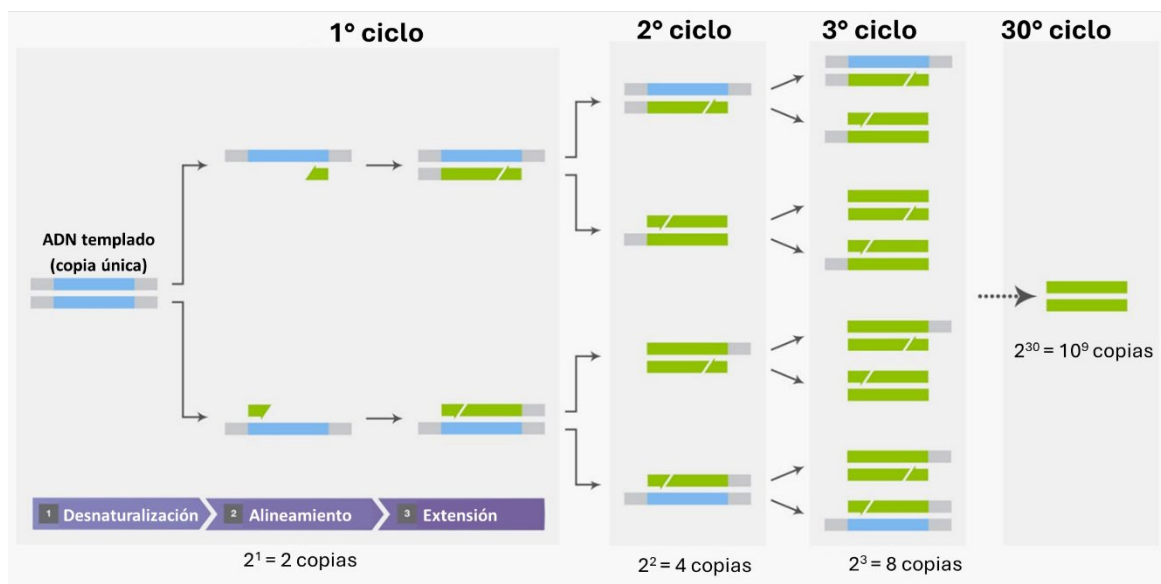


Figura 1. Pasos de la PCR (desnaturalización, alineamiento y extensión) como se muestra en el primer ciclo, y la amplificación exponencial del ADN objetivo con ciclos repetidos (Tomado y traducido de ^aThermo Fisher Scientific Inc. 2024).

2. qPCR y Discriminación Alélica

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (qPCR) monitorea el progreso de la amplificación a medida que ocurre; por lo tanto, los datos se recopilan durante todo el proceso de la PCR, en lugar de al final del mismo. En la qPCR, las reacciones se caracterizan por el momento durante el ciclo en el que se detecta por primera vez la amplificación de un objetivo; cuanto mayor sea el número de copias iniciales del ácido nucleico diana, mucho antes se observará un aumento significativo de la fluorescencia (^bThermo Fisher Scientific Inc. 2024).

Los ensayos de PCR en tiempo real de genotipado que utilizan sondas de hidrólisis o TaqMan® de la marca Applied Biosystems™ constan de un par de oligonucleótidos de PCR preoptimizados y dos sondas TaqMan® para discriminación alélica (una con una etiqueta del fluoróforo FAM y otra con una etiqueta del fluoróforo VIC en el extremo 5') presentan una región de unión al surco menor (MGB) que evita la degradación de la sonda por la ADN-polimerasa durante la fase de extensión de la PCR y un apagador no fluorescente (*NFQ*, *non-fluorescent quencher*) en el extremo 3' (^cThermo Fisher Scientific Inc. 2024).

Los ensayos de genotipado TaqMan se utilizan para amplificar y detectar alelos específicos en el ADN genómico (ADNg). La **Figura 2** muestra el proceso del ensayo de genotipado de un SNV mediante el uso de sondas TaqMan, como se describe a continuación (Applied Biosystems, 2010):

- El ADN genómico se introduce en una mezcla de reacción o *TaqMan® Genotyping Master Mix*, un par de cebadores y dos sondas TaqMan® MGB.
- Cada sonda TaqMan MGB (*minor groove binder*) se hibrida específicamente con una secuencia complementaria a cada alelo, si éste está presente; cuando la sonda está intacta, la proximidad del apagador al fluoróforo indicador suprime la fluorescencia indicadora (estructura en resonancia).
- La actividad exonucleasa de la ADN polimerasa escinde solo las sondas hibridadas con el objetivo. La escisión separa el fluoróforo reportero del apagador, aumentando la emisión de fluorescencia. El aumento de la fluorescencia se produce sólo si la secuencia diana amplificada es

complementaria a la sonda. Así, la señal de fluorescencia generada por la amplificación por PCR indica qué alelos están en la muestra.

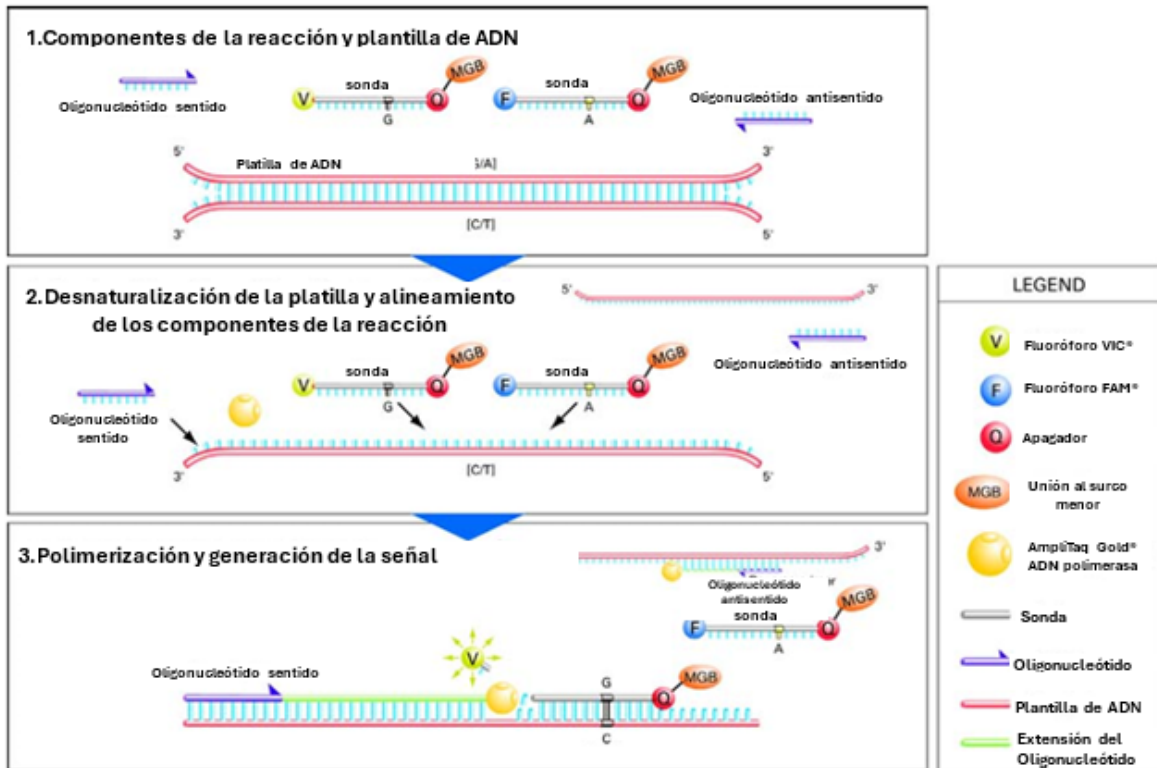


Figura 2. Proceso del ensayo de genotipado de la SNV con sondas TaqMan®. 1. Componentes de la reacción con el ADN sin desnaturalizar. 2. Desnaturalización del ADN y alineamiento de los componentes del ensayo. 3. Polimerización y generación de la señal. (Tomado y traducido de Applied Biosystems 2010).

a) Gráficos de discriminación alélica

El programa de los instrumentos de PCR en tiempo real traza los resultados de los datos de discriminación alélica como una gráfica del alelo 1 (colorante VIC™) frente al alelo 2 (colorante FAM); el diagrama de discriminación alélica (AD), también conocido como diagrama de conglomerados o diagrama de dispersión, representa cada muestra como un punto individual en el diagrama; un gráfico típico de AD muestra grupos de homocigotos, un grupo de heterocigotos y los controles; los puntos de cada grupo (*cluster*) se agrupan muy juntos y, a su vez, cada grupo se encuentra muy lejos de los demás *clusters* como se observa en la **Figura 3** (Thermo Fisher Scientific Inc, 2017).

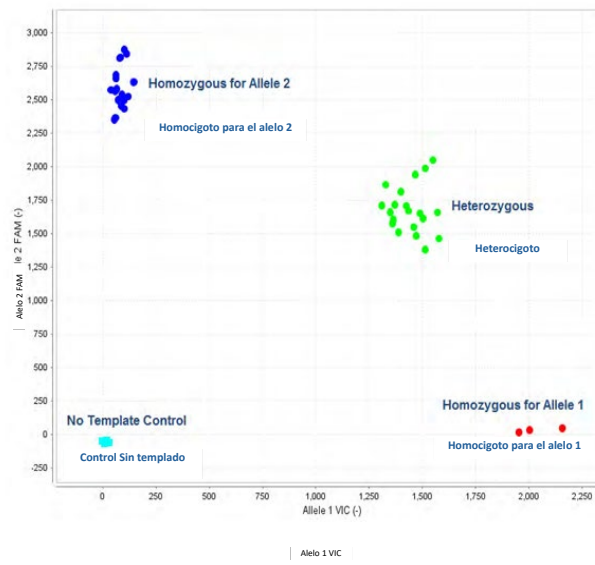


Figura 3. Gráfico de discriminación alélica. (Tomado y traducido de Thermo Fisher Scientific Inc. 2017).

3. Secuenciación de Sanger

La secuenciación de Sanger se dirige a una región específica del ADN molde utilizando un oligonucleótido de secuenciación, que se une al ADN adyacente a la región de interés (debe haber un área de secuencia conocida cerca del ADN objetivo). Para determinar la secuencia, la secuenciación de Sanger utiliza análogos químicos de los cuatro nucleótidos del ADN; a estos análogos, llamados didesoxirribonucleótidos (ddNTP), les falta el grupo hidroxilo 3' que se requiere para la extensión de 5' a 3' de una cadena de polinucleótidos de ADN. En una reacción con ddNTP marcados con un color diferente para cada base, desoxirribonucleótidos trifosfato o dNTP no marcados, ADN templado y polimerasa, se producen hebras de diferente longitud cuando los ddNTP se incorporan aleatoriamente y terminan la cadena. Posteriormente, los productos de extensión se separan mediante electroforesis y se detectan mediante sus etiquetas fluorescentes, donde cada color identifica uno de los ddNTP terminales (Thermo Fisher Scientific Inc, 2024).

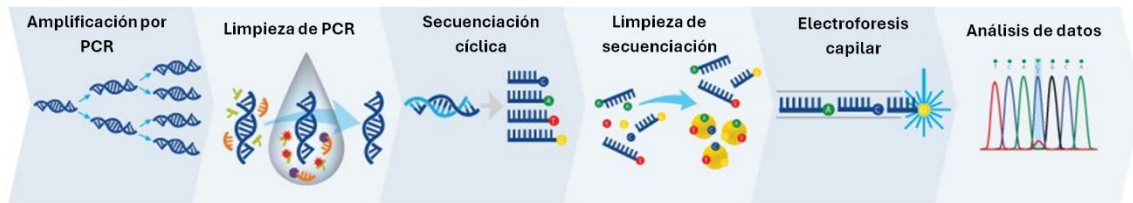


Figura 4. Diagrama de flujo para realizar secuenciación de Sanger (Tomado y traducido de (eThermo Fisher Scientific Inc, 2024).

La secuenciación de Sanger puede llevarse a cabo en seis pasos (**Figura 4**); el primero es la amplificación por PCR de la secuencia objetivo para garantizar que habrá suficiente templado para la reacción de secuenciación; después un paso de limpieza para eliminar el exceso de oligonucleótidos; los productos de la PCR se utilizan posteriormente en una reacción de secuenciación cíclica para generar fragmentos terminados en cadena; sigue otro paso de limpieza para eliminar los ddNTP no incorporados que podrían afectar la capacidad del analizador genético; y finalmente los fragmentos se separan mediante electroforesis capilar y la secuencia se lee utilizando un programa de análisis de secuencias (eThermo Fisher Scientific Inc, 2024).

a) Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (CE) es una técnica de electroforesis que utiliza pequeños capilares de vidrio llenos de polímero; cada reacción de secuenciación se ejecuta en un único capilar. La electroforesis dentro de estos capilares separa por los fragmentos marcados de cadenas de terminación de diferente longitud a medida que éstos migran a través del capilar, un láser excita la marca fluorescente en el ddNTP incorporado al final de cada fragmento; ya que cada uno de los cuatro ddNTP está etiquetado con un color diferente, la señal emitida por cada nucleótido excitado corresponde a una base específica; una vez finalizada la ejecución y con la ayuda de un programa se obtiene un cromatograma como el de la **Figura 5** (eThermo Fisher Scientific Inc, 2024).

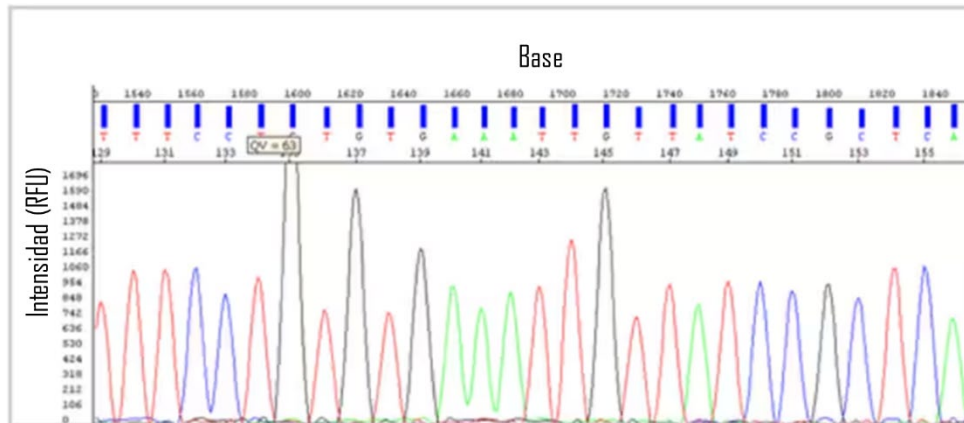


Figura 5. Cromatograma. Gráfico obtenido de la salida de datos de una secuenciación de Sanger (Tomado y traducido de °Thermo Fisher Scientific Inc. 2024).

4. Análisis de metilación del ADN

La pirosecuenciación se considera el estándar de oro para los estudios de metilación del ADN; la pirosecuenciación con bisulfito es una técnica cuantitativa que se basa en la amplificación del ADN convertido con bisulfito mediante PCR y posterior pirosecuenciación (Pajares *et al.*, 2021).

a) Tratamiento del ADN con bisulfito de sodio

El tratamiento del ADN con bisulfito de sodio desamina las citosinas no metiladas a uracilos, mientras que las citosinas metiladas están protegidas químicamente y permanecen como citosinas metiladas (Pajares *et al.*, 2021).

La amplificación por PCR del ADN tratado con bisulfito se realiza mediante cebadores biotinilados, lo que permite la purificación y la retención de la plantilla monocatenaria que contiene la biotina (Pajares *et al.*, 2021).

b) Pirosecuenciación

La diferencia entre la pirosecuenciación y la secuenciación de Sanger se basa en la detección del grupo pirofosfato (PPi), liberado por la incorporación de nucleótidos durante la reacción de extensión del cebador, en lugar de la terminación de la cadena con didesoxinucleótidos (Pajares *et al.*, 2021).

La pirosecuenciación comienza cuando un oligonucleótido de secuenciación se hibrida con un templado de ADN monocatenario amplificado por PCR; el

templado se incubaba con enzimas y sustratos (QIAGEN, 2013). Posteriormente el primero de los cuatro nucleótidos se agrega a la reacción; si el nucleótido es complementario a la base de la hebra molde, será incorporado a la hebra de ADN por la ADN polimerasa; cada evento de incorporación se acompaña de la liberación de pirofosfato (PPi) en una cantidad equivalente a la cantidad de nucleótido incorporado (**Figura 6A**) (QIAGEN, 2013).

La ATP sulfurilasa catalizará la unión del fosfosulfato de adenosina (APS) a PPI para generar ATP, que es utilizado por la luciferasa para convertir la luciferina en oxiluciferina y producir luz visible (**Figura 6B**) (Pajares *et al.*, 2021). La luz se detecta mediante dispositivos de carga acoplada (CCD) y se ve como un pico en el pirograma; donde cada señal luminosa es proporcional al número de nucleótidos incorporados (QIAGEN, 2013).

La apirasa degrada el dNTP no incorporado así como el ATP residual (**Figura 6C**); una vez finalizada la ronda, se añadirá otro tipo de dNTP y se repetirá el proceso (Pajares *et al.*, 2021). A medida que el proceso continúa, se construye la secuencia complementaria y se determina la secuencia de nucleótidos a partir del pico en el pirograma (**Figura 6D**) (QIAGEN, 2013).

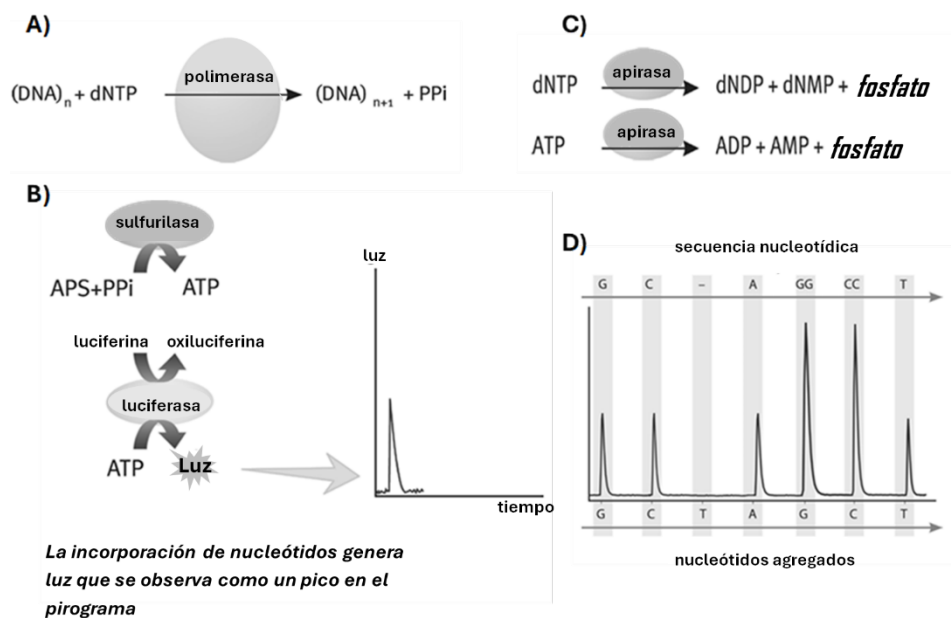


Figura 6. Pirosecuenciación. **A)** Incorporación de nucleótidos y liberación de pirofosfato (PPi) **B)** Unión del fosfosulfato de adenosina (APS) a PPi por acción de la sulfurilasa para generar ATP; conversión de luciferina en oxiluciferina por acción de la luciferasa para producir luz visible **C)** Degradación de dNTP y ATP por la acción de la apirasa. **D)** Pirograma: gráfico obtenido del análisis por pirosecuenciación (Tomado y traducido de QIAGEN. 2013).

El porcentaje de metilación se calculará a partir de la relación entre las alturas de un pico de citosina (señal metilada) y la suma de un pico de citosina y timina (señal metilada y no metilada) (Ronaghi *et al.*, 1998). Por lo tanto, el análisis de metilación del ADN por pirosecuenciación permite el análisis y la cuantificación simultánea del estado de metilación de cada sitio CpG (Pajares *et al.*, 2021).

VI. Metodología

Este trabajo se desarrolló dentro del protocolo 161/22 y cuenta con la aprobación de los Comités de Ética y de Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNNMVS). A continuación, se muestra el esquema con un resumen de la metodología empleada para el desarrollo del presente trabajo.

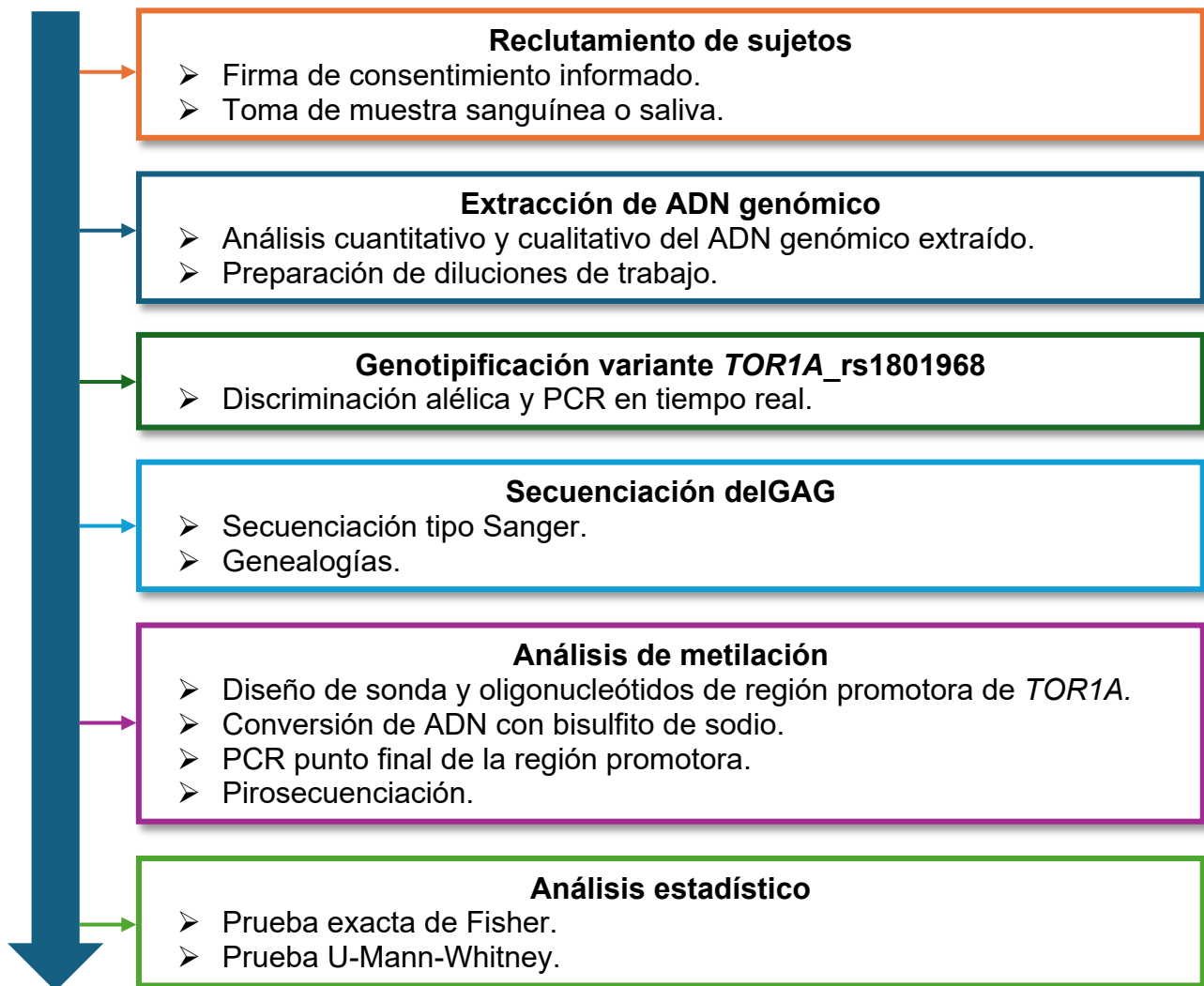


Figura 7. Esquema de la metodología empleada.

A. Sujetos

Siguiendo los requerimientos éticos y previa firma del consentimiento informado (**Anexo 1**) se incluyeron 33 individuos correspondientes al grupo DYT (pacientes con diagnóstico de distonía asociada a *TOR1A* portadores de la delGAG y sus familiares) y **29 individuos del grupo CTU** (controles pareados por edad y sexo). De cada uno de los pacientes se registraron los datos sociodemográficos: edad, género, antecedentes heredofamiliares, características clínicas y puntaje de la escala *Unified Dystonia Rating Scale* (UDRS) (**Anexo 2**).

1. Criterios de selección de pacientes y familiares

Se incluyeron pacientes de cualquier sexo y edad con diagnóstico molecular confirmatorio de distonía por variante patogénica delGAG en el gen *TOR1A*; así como a los familiares de dichos pacientes que aceptaron participar en el estudio firmando una carta de consentimiento informado. Se excluyeron los pacientes y familiares que decidieron no participar o continuar en el estudio.

2. Criterios de selección de controles

Se incluyeron sujetos sanos pareados por edad y sexo con el grupo de pacientes y familiares que aceptaron participar en el estudio firmando una carta de consentimiento informado. Se excluyeron a aquellos individuos que decidieron no continuar en el estudio.

B. Toma de muestra biológica

1. Sangre periférica

Siguiendo los lineamientos éticos y posterior a la obtención del consentimiento informado de los pacientes, familiares y controles, se realizó la toma de muestra (18 mL) de sangre periférica en tubos Vacutainer® con anticoagulante citratos-dextrosa (ACD). Las muestras sanguíneas se centrifugaron para separar el plasma y el paquete leucocitario; posteriormente se almacenaron en congelación hasta su uso y se identificaron con código alfanumérico, cumpliendo con las normas de ética para la investigación de confidencialidad para el manejo anónimo de las muestras de todos los participantes.

2. Saliva

En los casos en los cuales no fue posible obtener muestras de sangre periférica de pacientes y controles; se realizó la toma de muestra (2 mL) de saliva en contenedores *DNA/RNA Shield™ saliva/sputum collection kit*, posterior a la obtención del consentimiento informado. Las muestras se almacenaron en refrigeración hasta su uso y se identificaron con código alfanumérico, cumpliendo con las normas de ética para la investigación de confidencialidad para el manejo anónimo de las muestras de todos los participantes.

3. Trabajo de campo

Se tuvo que realizar trabajo de campo para obtener muestras de algunos familiares, por lo que se viajó al municipio de Apizaco en el estado de Tlaxcala y al estado de Veracruz. Posterior a la obtención del consentimiento informado, se obtuvieron muestras sanguíneas y de saliva como se describió anteriormente y se identificaron con código alfanumérico. Además, el médico genetista realizó una evaluación clínica de los familiares empleando la escala *Unified Dystonia Rating Scale (UDRS)*.

C. Extracción de ADN genómico

1. Sangre periférica

Cada uno de los tubos de sangre periférica (6 mL) se dividió en 2 alícuotas de trabajo (3 mL) para la extracción del DNA genómico por el método de sales. A un volumen de la sangre obtenida se agregaron 3 volúmenes de una solución amortiguadora de lisis de glóbulos rojos (BLGR) [cloruro de amonio 0.155M, bicarbonato de potasio 10mM, EDTA 0.5M pH=8], se centrifugó y decantó el sobrenadante. Posteriormente el botón de células mononucleares (CMN) se resuspendió con solución BLGR y se centrifugó, se repitieron estos lavados hasta obtener un botón blanco.

Después se agregaron 570µL de NaCl [5mM], 40µL del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) [10% v/v] y 200µL de NaCl [7M]; se agitó y centrifugó. Se recuperó el sobrenadante y se agregaron 600µL de alcohol isoamílico-cloroformo

en una proporción 49:1 (v/v), se agitó y centrifugó; después se retiró cuidadosamente la fase acuosa a la que se agregaron 800µL de etanol absoluto y se centrifugó nuevamente. Finalmente, el botón de ADN se lavó con 700µL de etanol al 70% (v/v), se centrifugó y secó al vacío para ser resuspendido en agua libre de nucleasas (100-300µL) e incubarse durante 1 hora a 60°C a 950 rpm. Posteriormente se cuantificó y se prepararon diluciones a 50 ng/ µL de las muestras.

2. Saliva

Se transfirieron 1000 µL de muestra de saliva, se agregó 1/25 volumen de *Orange purifier*, enseguida se homogeneizó en vórtex e incubó en hielo de 15-20 minutos. Después de centrifugar al sobrenadante se añadió cloroformo: alcohol isoamílico (49:1) en proporción 1:1; colocando por cada 500 µL de sobrenadante 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico.

Después de centrifugar se retiró la fase acuosa y se agregaron 500µL de etanol absoluto y 25 µL de acarreador de ADN, se dejó en refrigeración durante 24 horas. Posteriormente se centrifugó, se descartó el sobrenadante y el botón de ADN se lavó con 700µL de etanol al 70% (v/v). Finalmente se centrifugó, se decantó y el ADN secó al vacío. El ADN se resuspendió en agua libre de nucleasas (50-200µL) y se incubó durante 1 hora a 60°C a 950 rpm. Posteriormente se cuantificó y se prepararon diluciones a 50 ng/ µL de las muestras.

3. Manejo de desechos biológicos

Se realizó siguiendo los estándares internacionales. Inactivando con solución con hipoclorito de sodio el sobrenadante de paquete globular diluido obtenido durante la extracción. Los tubos que contenían la muestra después de la extracción fueron depositados en contenedor rojo.

4. Análisis cuantitativo del ADN genómico

Se realizó la cuantificación de las muestras en el espectrofotómetro *Thermo Scientific™ NanoDrop™ One* para determinar su concentración y pureza; se establecieron como parámetros de una pureza óptima un valor de entre 1.8-2.0 en relación A260/280 y un valor >1.8 en la relación A260/230. Se empleó como blanco

1 μL de agua libre de nucleasas y se utilizó 1 μL de la muestra diluida (50 ng/ μL) para cada lectura. Cada muestra se cuantificó dos veces.

5. Análisis cualitativo del ADN genómico

Se llevó a cabo para determinar la integridad del ADN extraído. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TBE 1X. Se emplearon 5 μL de la dilución (50 ng/ μL) del ADN de cada una de las muestras; 5 μL de la escalera de peso molecular de 100 pb-3 kb *Solis BioDyne® 100 bp DNA Ladder Ready to Load*; finalmente se mezcló 1 μL de colorante de carga Gelred® con el marcador de peso molecular y con cada una de las muestras. Las condiciones de corrida para la electroforesis fueron 100 v durante 30 minutos.

D. Genotipificación de la variante *TOR1A_rs1801968*

El análisis de la variante *TOR1A_rs1801968* (c.646C>G; D216H) se llevó a cabo mediante discriminación alélica y PCR en tiempo real empleando el equipo *QuantStudio® 5 Real-Time PCR Instrument (96-well 0.1ml block)*. Se utilizó el paquete comercial *KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (2x) de Kapa Biosystems®*; la sonda comercial *C_7428931_10* de la marca *ThermoFisher*, diluciones de ADN de las muestras a una concentración de 50 ng/ μL y se incluyó un blanco en cada una de las corridas. Los reactivos y cantidades empleadas se muestran en la **Tabla 1** y las condiciones del ensayo se muestran en la **Figura 8**.

Tabla 1. Mezcla de reacción para el genotipado de la variante *TOR1A_rs181968*.

Reactivo	Cantidad (x1)
<i>KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (2X)</i>	2.5 μL
Sonda <i>C_7428931_10</i>	0.125 μL
Agua libre de nucleasas	1.375 μL
ADN (50ng/ μL)	1.0 μL
Volumen de reacción	5.0 μL

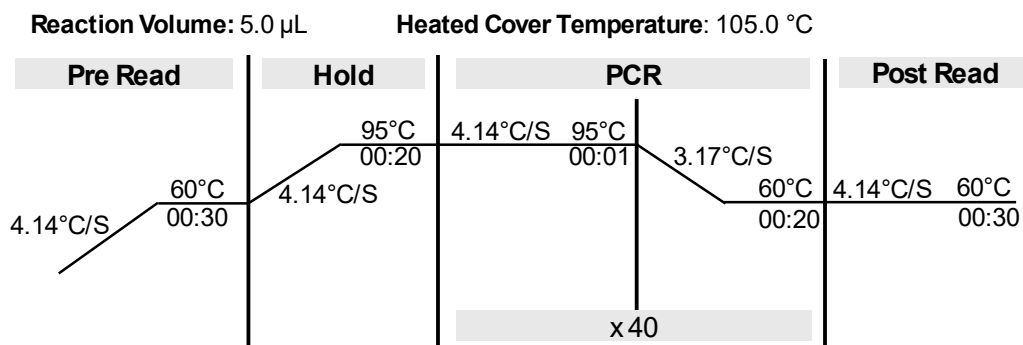


Figura 8. Condiciones de amplificación para la genotipificación de la variante *TOR1A_rs1801968*. Gráfico obtenido del equipo *QuantStudio® 5 Real-Time PCR Instrument (96-well 0.1ml Block)*.

E. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del exón 5 de *TOR1A*

Se realizó PCR punto final para amplificar una región (205 pb) del exón 5 del gen *TOR1A* para identificar la presencia de la variante patogénica delGAG (c.907_909del). Para ello, se utilizaron las diluciones de las muestras de ADN a una concentración de 50 ng/ μ L; alícuotas de los oligonucleótidos a una concentración de 10 μ M (*Forward*: CCTGGAATACAAACACCTA y *Reverse*: GGCTGCCAATCATGACTGTC) y *KAPA2G Fast HS ReadyMix (2x)*. La mezcla de reacción izada se muestra en la **Tabla 2** y las condiciones de tiempo y temperatura para la amplificación en un termociclador *Applied Biosystems 9700* se muestran en la **Figura 9**.

Tabla 2. Mezcla de reacción para PCR del exón 5 de *TOR1A*.

Reactivo	Cantidad (x1)
<i>KAPA 2G Fast HS Ready Mix (2X)</i>	12.5 μ L
10 μ M Oligonucleótido Forward	1.25 μ L
10 μ M Oligonucleótido Reverse	1.25 μ L
Agua libre de nucleasas	7.0 μ L
AND (50ng/ μ L)	3.0 μ L
Volumen de reacción	25.0 μ L

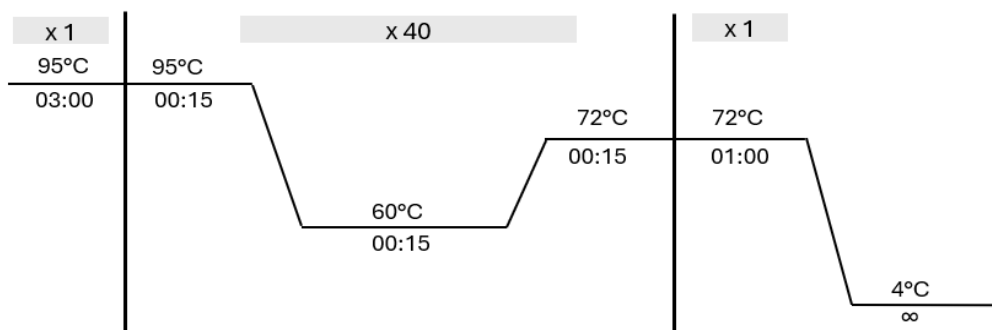


Figura 9. Condiciones para la PCR del exón 5 del gen *TOR1A*.

F. Secuenciación del exón 5 de *TOR1A*

Posterior al análisis de PCR, se verificó el amplicón (205 pb) por electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % en solución amortiguadora TBE 1X. Se emplearon 10 μL del producto amplificado; 8 μL de la escalera de peso molecular de 50 pb - 1 kb; *Thermo Scientific™ O'GeneRuler DNA Ladder, Ready-to-Use*; finalmente se mezcló 1 μL de colorante de carga Gelred® con el marcador de peso molecular y con cada una de las muestras. Las condiciones de corrida fueron 100 v durante 30 minutos.

En base a su concentración se preparó la mezcla de reacción de acuerdo a la **Tabla 3** y se siguieron las condiciones de la **Figura 10** para su secuenciación. Se limpió la reacción de secuenciación con el paquete comercial *DNA Sequencing Clean-up Kit™ (Zymo Research)* y se secó al vacío a temperatura ambiente en el equipo *Vacufuge plus Centrifuge Concentrator* (Eppendorf). Finalmente, el análisis de las secuencias se hizo utilizando el programa *SnapGene*.

Tabla 3. Mezcla de reacción para la secuenciación del exón 5 de *TOR1A*.

Reactivo	Cantidad (x1)
Mezcla comercial de reacción de secuenciación	1.0 μL
Oligonucleótido Forward [10uM]	1.0 μL
Amortiguador de secuenciación	2.0 μL
Amplicón purificado	Variable
Agua libre de nucleasas	c.b.p 10 μL
Volumen de reacción	10.0 μL

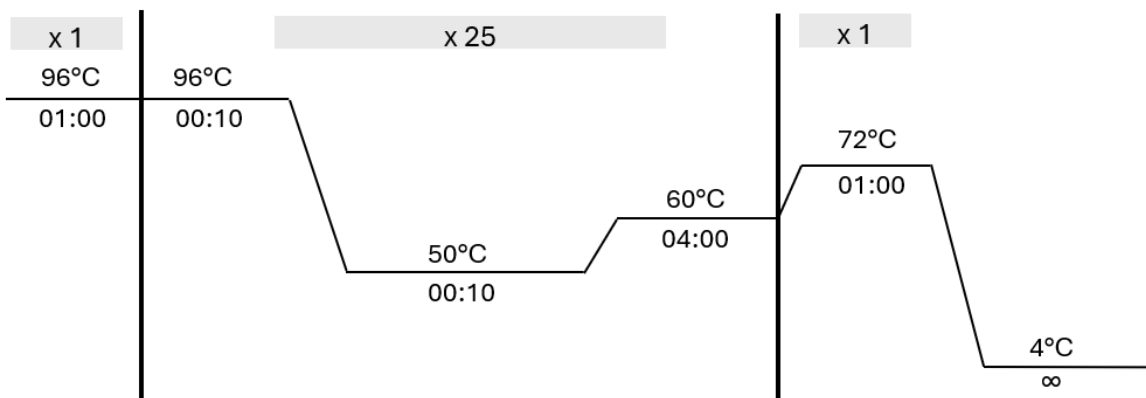


Figura 10. Condiciones para la reacción de secuenciación del exón 5 de *TOR1A*.

G. Determinación de la segregación en *cis* o *trans* de las variantes D216H y delGAG

En los casos en los que la genealogía lo permitiera, se realizó el análisis de segregación de las variantes estudiadas y se determinó en qué fase (*cis* o *trans*) se encontraban la variante *TOR1A*_rs1801968 con respecto a la delGAG de *TOR1A* en pacientes y familiares portadores.

H. Análisis de metilación

a) Diseño de sonda y oligonucleótidos

Con base en la literatura se diseñaron un par de oligonucleótidos y una sonda específica para amplificar y secuenciar la región promotora del gen *TOR1A* empleando el programa *PyroMark v2.0* (QIAGEN).

Los oligonucleótidos diseñados fueron los siguientes: *PCR Forward*: GGAGGAGGGTTGTTTTGAAGA; *PCR Reverse*: ACCCCACCCA ACTTCATACCC y de *Secuenciación*: ATGGTTTTAGAGAGAGGAGGAA. El amplicón obtenido es de 137 pb y la secuencia analizada por pirosecuenciación es la siguiente: TYGGAAGYGTGGGTTTGGYGGTTGTATYGGTTYGYGGTYGGYGYGAGAATAA GTAGGGTGG; incluyó 9 sitios CpG (representados por **Y= C o T, bases pirimidinas del ADN**).

b) Conversión del ADN con bisulfito de sodio

Se convirtieron 0.5 µg de ADN genómico con bisulfito de sodio utilizando el *EpiTect® Bisulfite Kit* de QIAGEN; y se siguió el procedimiento indicado en el manual *EpiTect® Bisulfite Handbook* de QIAGEN para conversión completa y limpieza del ADN para el análisis de metilación (QIAGEN, 2020).

c) Reacción en cadena de la polimerasa

Posterior a la estandarización de la PCR de punto final se amplificó la región de interés empleando la mezcla de reacción *PyroMark PCR Kit* (**Tabla 4**) y las condiciones mostradas en la **Figura 11**. Se verificó el tamaño del amplicón (137 pb) por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en solución amortiguadora TBE 1X. Se emplearon 2 µL del producto amplificado; 5µL de la escalera de peso molecular de 100 pb-3 kb *Solis BioDyne® 100 bp DNA Ladder Ready to Load*; finalmente se mezclaron 2 µL de colorante de carga Gelred® con el marcador de peso molecular y con cada una de las muestras. Las condiciones de corrida fueron 100 v durante 45 minutos.

Tabla 4. Mezcla de reacción para PCR de la región promotora de *TOR1A*.

Reactivo	Cantidad (x1)
<i>PyroMark PCR Master Mix (2X)</i>	7.5 µL
<i>Coral Load (10X)</i>	1.5 µL
Oligonucleótido [10uM]	1.0 µL
ADN convertido	5.0 µL
Volumen de reacción	15.0 µL

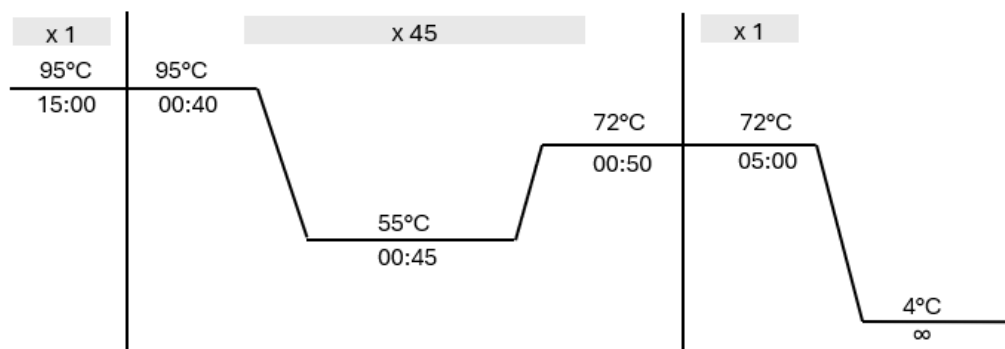


Figura 11. Condiciones de amplificación de la región promotora del gen *TOR1A*.

d) Pirosecuenciación

Finalmente se secuenciaron mediante pirosecuenciación utilizando las condiciones establecidas en el ensayo *Assay3 TOR1A* de PyroMark® para el gen *TOR1A* empleando el equipo PyroMark®Q24.

I. Análisis estadístico

Se analizaron las características sociodemográficas de los pacientes y controles. Los datos para las variables categóricas se presentaron como números y frecuencias, y como la media \pm desviación estándar para las variables continuas. La proporción de genotipos entre ambos grupos se evaluó con la prueba exacta de Fisher. El análisis de los niveles de metilación de la región promotora del gen *TOR1A* entre pacientes y controles se llevó a cabo mediante la comparación de medias por la prueba U-Mann-Whitney para muestras independientes. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico SPSS (versión 20, Chicago, IL). El nivel de significancia estadística para todos los análisis se estableció con una alfa de <0.05 .

VII. Resultados

1. Descripción de la muestra

Se han reclutado 62 individuos en el estudio, de los cuales 33 son parte del grupo DYT y 29 individuos son del grupo CTU. El primer grupo se compone de 13 muestras de pacientes y 20 muestras de familiares, de éstos últimos sólo 7 son portadores de la variante patogénica delGAG y de ellos solamente uno está afectado (por lo que para los análisis de la frecuencia de la variante *TOR1A_rs1801968* y el análisis de metilación se consideró como paciente). El segundo grupo corresponde a individuos control pareados por edad y sexo. Las características de la muestra estudiada se resumen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Características demográficas de la muestra de estudio.

Grupo	Características			
	Individuos (N)	Sexo		Edad (años)
		Masculino N (%)	Femenino N (%)	media ± DE
CTU	29	13 (44.8)	16 (55.2)	38.48 ± 16.86
DYT	33	13 (39.4)	20 (60.6)	37.87 ± 17.02
P	14	7 (50.0)	7 (50.0)	
F	19	6 (31.58)	13 (32.42)	
FPAS	6	2 (33.3)	4 (66.7)	
FNP	13	4 (30.8)	9 (69.2)	
Total	62	26 (41.9)	36 (58.1)	

P: pacientes. F: familiares. FPAS: familiares portadores asintomáticos. FNP: familiares no portadores.

2. Identificación de la variante *TOR1A_rs1801968*

La variante *TOR1A_rs1801968* (c.646C>G: D216H) se genotipó en todas las muestras (3 de ellas están por duplicado porque fueron tomadas a tiempos diferentes para comparar porcentajes de metilación longitudinales); incluyendo 29 individuos del grupo CTU y 30 del grupo DYT. Los gráficos representativos de cada uno de los genotipos observados se aprecian en la **Figura 12** y los resultados de la muestra estudiada en la **Tabla 6**.

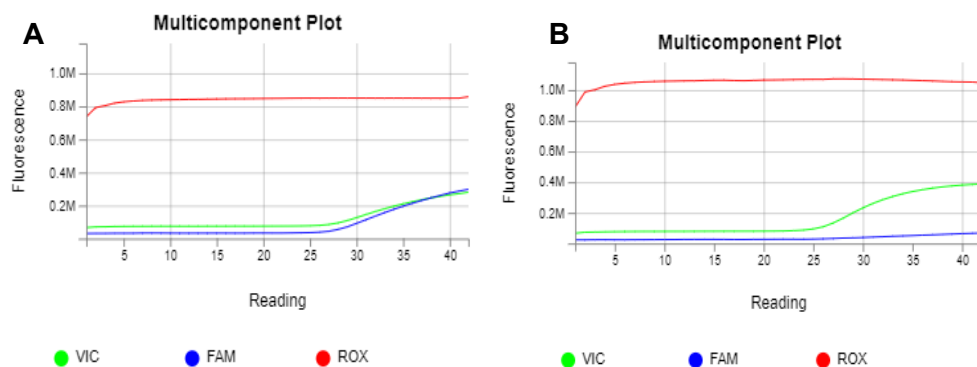


Figura 12. Gráfico multicomponente. **A:** Genotipo heterocigoto CG. **B:** Genotipo homocigoto CC de la variante *TOR1A_rs1801968*. Donde **VIC** representa: Alelo C y **FAM:** Alelo G.

Tabla 6. Genotipado de la variante *TOR1A_rs1801968*.

Grupo	Características					
	Individuos (N)	Genotipo (Frecuencia genotípica)		Frecuencia alélica		Prueba de Fisher Valor de P
		CC	CG	C	G	
CTU	29	22 (0.76)	7 (0.24)	51(0.88)	7(0.12)	0.7611*
DYT	30	24 (0.80)	6 (0.20)	54(0.90)	6(0.10)	0.7753**
P	12	10 (0.83)	2 (0.16)	22(0.92)	2(0.08)	1.000*
F	18	14 (0.78)	4 (0.22)	32(0.89)	4(0.11)	1.000**
FNP	13	10 (0.77)	3 (0.23)	23(0.88)	3(0.12)	1.000*
FPA	5	4 (0.80)	1 (0.20)	9(0.90)	1(0.10)	1.000**
Total	59	46 (0.78)	13 (0.22)	105(0.89)	13(0.11)	

CTU: individuos sanos. DYT: pacientes y familiares. P: pacientes. F: familiares. FNP: familiares no portadores. FPA: familiares portadores asintomáticos. *Comparación de frecuencia genotípica. **Comparación de frecuencia alélica.

3. Secuenciación del exón 5 de *TOR1A*

Se realizó la secuenciación para identificar la presencia de la variante patogénica delGAG en 19 muestras correspondientes a familiares de pacientes con distonía.

Se identificaron 6 familiares del paciente DYT-123 portadores de la variante delGAG; (DYT-128, 134, 135, 143, 144 y 124(23)); de estos sólo DYT-134 presentaba características clínicas por lo que se clasificó como paciente; mientras que el resto fueron clasificados como familiares portadores asintomáticos.

De los familiares del paciente DYT-99 y del paciente DYT-146 ninguno resultó se portador de la variante patogénica. Los resultados se resumen en la **Tabla 7**. En la **Figura 13** se muestran dos electroferogramas correspondientes a los familiares analizados donde se puede observar la presencia de la variante patogénica delGAG.

Tabla 7. Resultados de la secuenciación para determinar a los portadores de la variante patogénica delGAG causante de DYT-TOR1A.

Muestra	Variante delGAG Exón 5 de TOR1A
DYT-128	Portador
DYT-129	No portador
DYT-130	No portador
DYT-131	No portador
DYT-132	No portador
DYT-133	No portador
DYT-134	Portador
DYT-135	Portador
DYT-136	No portador
DYT-137	No portador
DYT-138	No portador
DYT-139	No portador
DYT-140	No portador
DYT-141	No portador
DYT-142	No portador
DYT-143	Portador
DYT-144	Portador
DYT-145	No Portador
DYT-124(23)	Portador

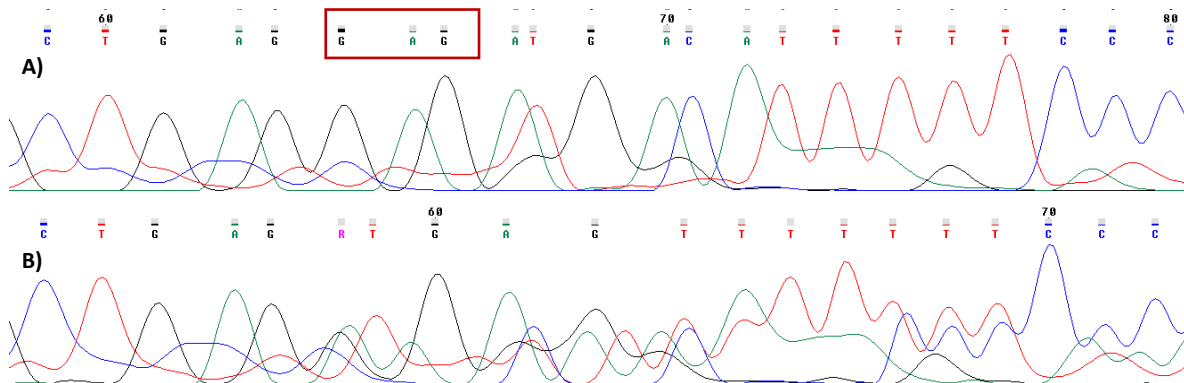


Figura 13. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 5 del gen *TOR1A*. **A)** Familiar DYT-129, no presenta la delección del triplete GAG (rectángulo rojo). **B)** Familiar DYT-128, presenta delección en estado heterocigoto del triplete GAG.

4. Determinación de la fase de la segregación en *cis* o *trans* de dos variantes en *TOR1A*.

Una vez identificadas las variantes delGAG y *TOR1A_rs1801968* (D216H) en los familiares de los pacientes DYT-123 (14 familiares), DYT-99 (2 familiares) y DYT-146 (3 familiares) fue posible realizar las genealogías extendidas de estos pacientes

y analizar la segregación de la variante de riesgo en *TOR1A_rs1801968* con respecto a la variante patogénica delGAG.

En la **Figura 14** se muestran los resultados correspondientes a los familiares del paciente DYT-123, el cual es portador de la variante patogénica delGAG, pero no de la variante *TOR1A_rs1801968*. Se identificaron a 5 familiares (DYT-124, 128, 134, 135, 143 y 144) portadores de la variante patogénica delGAG, 1 familiar portador de la variante *TOR1A_rs1801968* (DYT-133) y 1 familiar portador de ambas variantes (DYT-135). Con lo anterior se puede inferir que en el paciente DYT-123 y sus familiares DYT-124, 128 Y 134, el alelo H de la variante *TOR1A_rs1801968* y la delGAG se encuentran en *cis*; mientras que en el caso del familiar DYT-135 se pudo determinar que el alelo D de la variante se encuentra en *trans* con respecto a la variante patogénica.

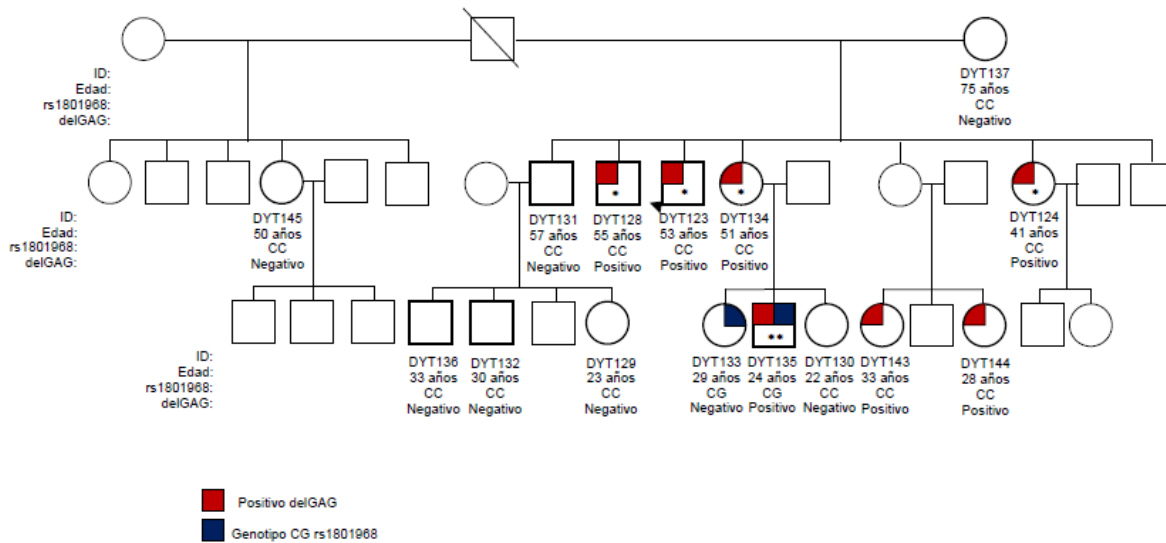


Figura 14. Genealogía del paciente DYT-123. Círculos: sexo femenino. Cuadrados: sexo masculino. Color rojo: variante delGAG (p.Glu303del) positiva. Color azul: genotipo CG de la variante *TOR1A_rs1801968*. *Variantes en *cis*. ** Variantes en *trans*. ID: código identificador alfa-numérico de las muestras.

En la **Figura 15** se muestran los resultados correspondientes a los familiares del paciente DYT-99 el cual es portador tanto de la variante patogénica delGAG

como de la variante *TOR1A_rs1801968*. En sus familiares se identificó a un individuo portador de la variante *TOR1A_rs1801968* (DYT-138) y ninguno de ellos resultaron portadores de la variante patogénica. Con ello se pudo determinar que en el paciente DYT-99 que la segregación de ambas variantes se encuentra en *trans* y debido a que ninguno de los progenitores del paciente son portadores de la delGAG, se infiere que la variante delGAG es *de novo*. Sin embargo, debe resaltarse que no se realizaron pruebas de paternidad para confirmarlo.

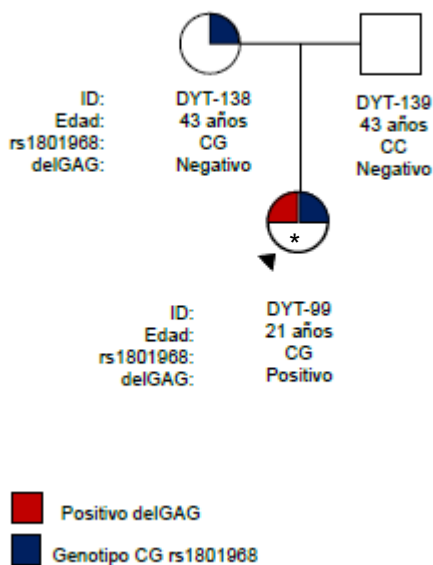


Figura 15. Genealogía del paciente DYT-99. Paciente: DYT-99. Familiares: DYT-138 y DYT-139. Círculos: sexo femenino. Cuadrados: sexo masculino. Color rojo: variante p.Glu303del positiva. Color azul: genotipo CG de la variante *TOR1A_rs1801968*. *Variantes en *trans*.

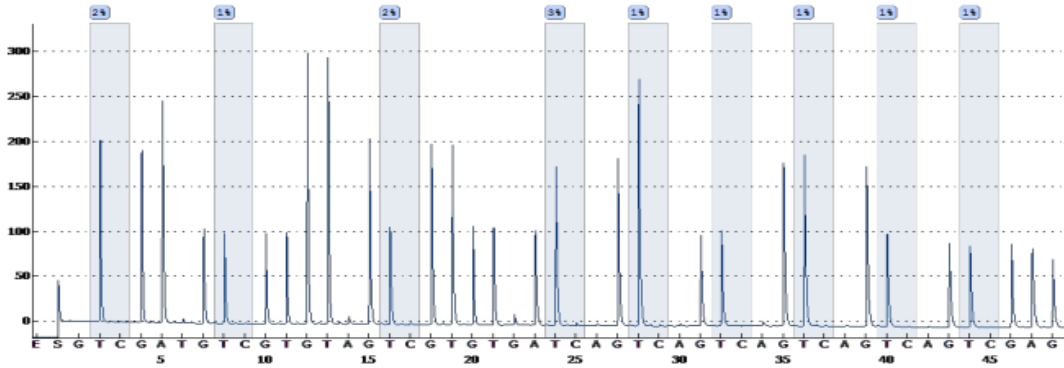
No se realizó genealogía de los familiares del paciente DYT-146; ya que en ninguno de ellos fue identificada la delección GAG.

5. Análisis de metilación de la región promotora del gen *TOR1A*.

En el análisis de metilación de la región promotora del gen *TOR1A* se analizaron 9 sitios CpG por pirosecuenciación. Este análisis se realizó en 33 pacientes y familiares (DYT) y 27 individuos control (CTU). Se compararon las medias de los porcentajes de metilación de cada uno de los sitios CpG por prueba U de Mann-Whitney; entre los grupos de estudio y también se compararon los

niveles de metilación de los pacientes DYT-123 y DYT-99 a dos diferentes tiempos en que se tomó la muestra para determinar si existían cambios. En la **Figura 16** se muestra una imagen representativa del pirograma obtenido usando pirosecuenciación.

Assay: Assay3 TORIA
 Sample ID: DYT-140
 Note:
 Analysis version: 2.0.8



Sequence to analyze:

TYGGAAAGYGTGGGTTTGGYGGTGTATYGGTTYGYGGTYGGYGYGAGAATAAGTAGGGTGG

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Quality	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Meth (%)	2	1	2	3	1	1	1	1	1

Figura 16. Imagen representativa del pirograma obtenido por pirosecuenciación. Muestra: DYT-140. E: Enzima. S: Sustrato. A: Adenina. C: Citosina. G: Guanina. T: Timina. Y: Sitios CpG analizado (citosinas metiladas).

Los resultados se muestran en la **Tabla 8**. Se muestra de manera gráfica la metilación en cada uno de los sitios CpG analizados en cada uno de los grupos comparados en la **Figura 17**.

En los gráficos de la **Figura 18** se muestra la distribución de la metilación al comparar pacientes con portadores asintomáticos tanto la metilación total como particularmente la de los dos sitios CpG que mostraron diferencias estadísticas.

La **Figura 19A** muestra el gráfico correspondiente a la comparación de las muestras del paciente DYT-123 tomadas a 2 diferentes tiempos; mientras que en la **Figura 19B** corresponde a la comparación a 2 diferentes tiempos, pero del paciente DYT-99.

Tabla 8. Niveles de metilación del promotor del gen *TOR1A*

GRUPO	Sitio CpG analizado (media del % de metilación)									Media
	CpG_1	CpG_2	CpG_3	CpG_4	CpG_5	CpG_6	CpG_7	CpG_8	CpG_9	
CTU	2.62	1.62	2.79	4.10	2.32	1.50	1.97	1.59	1.61	2.23
DYT	2.58	1.57	2.61	3.82	2.39	1.55	1.84	1.52	1.51	2.15
SIG.	0.905	0.947	0.864	0.431	0.876	0.572	0.806	0.970	0.801	0.911
GRUPO DYT										
P	3,10	1,92	2,97	4,47	2,88	1,86	2,23	1,71	1,72	2.54
F	2,20	1,31	2,34	3,35	2,04	1,32	1,56	1,37	1,36	1.87
SIG.	0.005*	0.017*	0.012*	0.026*	0.014*	0.021*	0.019*	0.199	0.157	0.004*
GRUPO F										
FPA	2,15	1,26	2,22	3,36	1,94	1,28	1,58	1,31	1,23	1.81
FNP	2.22	1.34	2.39	3.35	2.08	1.35	1.55	1.40	1.42	1.90
SIG.	1.000	0.831	0.579	0.765	0.701	0.701	0.765	0.521	0.831	0.898
GRUPO P										
P	3,10	1,92	2,97	4,47	2,88	1,86	2,23	1,71	1,72	2.54
FPA	2,15	1,26	2,22	3,36	1,94	1,28	1,58	1,31	1,23	1.81
SIG.	0.026*	0.076	0.041*	0.091	0.076	0.076	0.109	0.274	0.239	0.026*
MUESTRA DYT-123										
2022	2,92	1,47	2,74	4,26	1,98	1,45	1,85	1,38	1,30	2,15
2023	1,1	1,14	1,72	2,1	1,17	0,91	1,15	1	1,11	1,27
SIG.	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
MUESTRA DYT-99										
2016	3,19	2,67	2,62	5,04	3,00	1,65	2,57	1,27	2,59	2.73
2023	1,2	1,19	1,53	2,13	1,36	0,96	0,99	0,87	0,9	1.24
SIG.	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

CTU: Grupo Control (27 individuos sanos). **DYT:** Pacientes y familiares (33 individuos). **P:** Pacientes (14 individuos). **F:** Familiares (19 individuos). **FPA:** Familiares portadores de la variante delGAG (6 individuos) sin síntomas clínicos de distonía. **FNP:** Familiares no portadores de la variante delGAG (13 individuos). **2016,2022,2023:** año de toma de las muestras. *Diferencias estadística. SIG: significancia, valor de p.

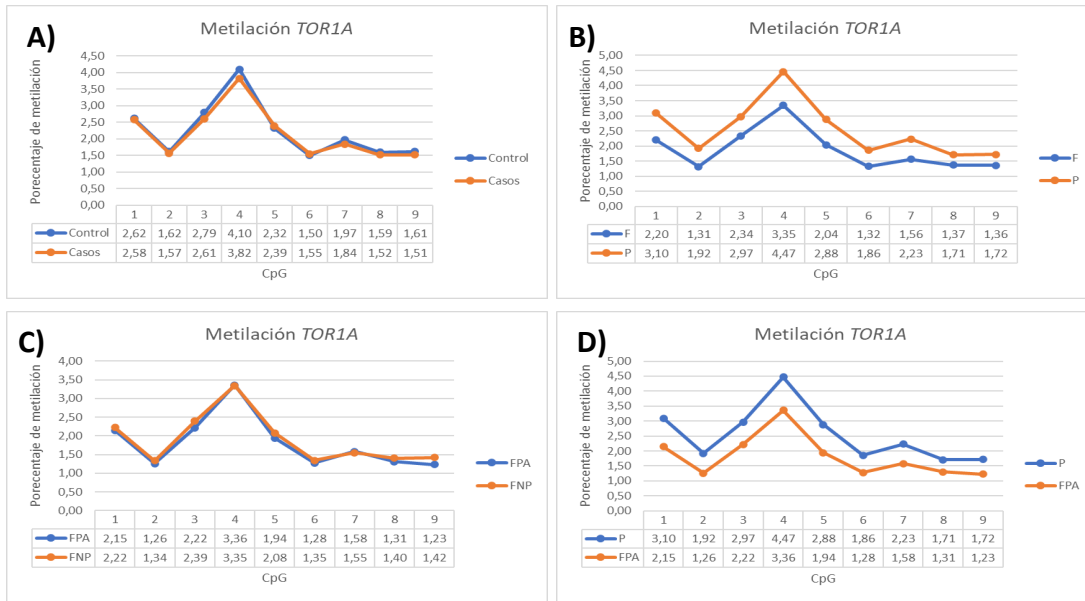


Figura 17. Comparación del porcentaje de metilación en cada uno de los sitios CpG analizados de *TOR1A*. **A)** Grupo CTU (individuos sanos) vs grupo DYT (pacientes y familiares). **B)** Grupo F (familiares) vs grupo P (pacientes). **C)** Grupo FPA (familiares portadores de delGAG asintomáticos) vs grupo FNP (familiares no portadores de la delGAG). **D)** Grupo P vs grupo FPA.

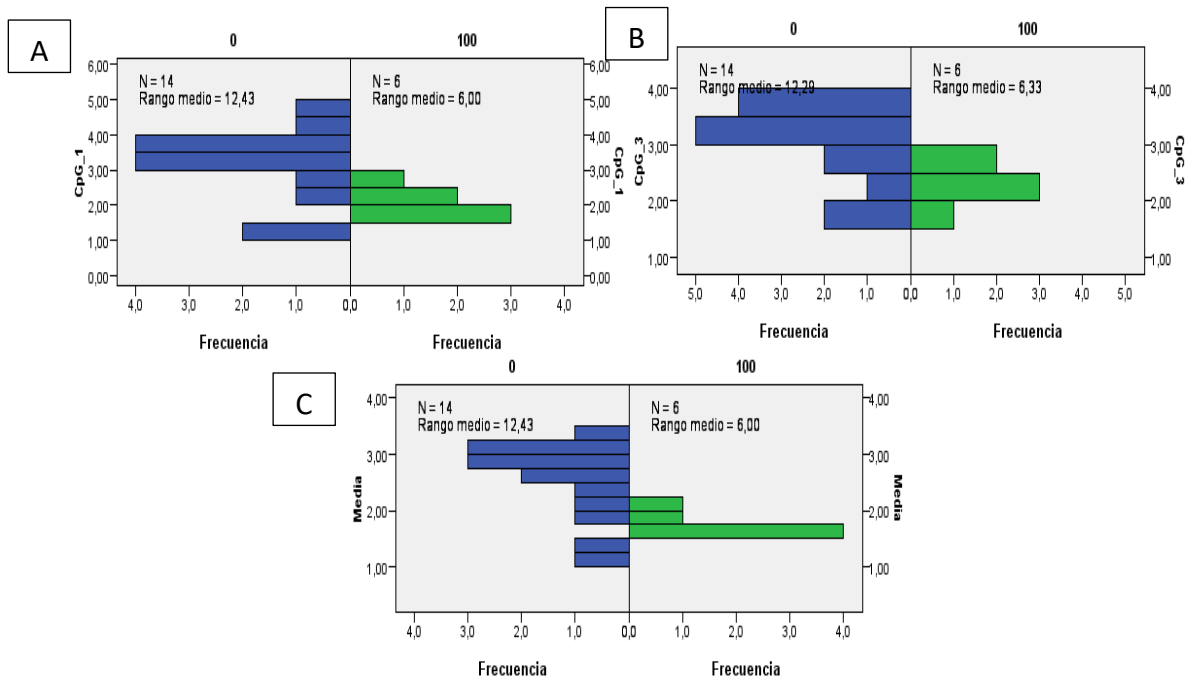


Figura 18. Análisis de metilación pacientes vs portadores asintomáticos. **(A)CpG1 y (B) CpG_3:** Sitios analizados que mostraron diferencia estadística. **(C)Media:** análisis de metilación total. **0:** pacientes. **100:** portadores asintomáticos. **Eje vertical:** porcentaje de metilación.

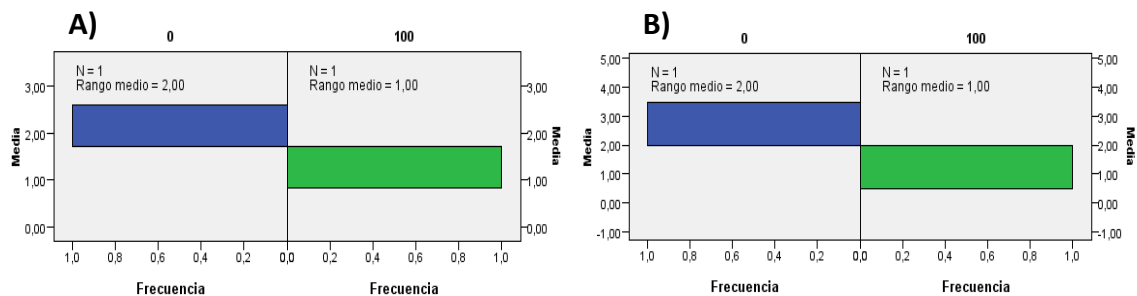


Figura 19. Análisis de metilación. **A) DYT-123:** comparación del nivel de metilación en el año 2022 (0) vs 2023 (100). **B) DYT-99:** comparación del nivel de metilación en el año 2016 (0) vs 2023 (100). **Eje vertical:** porcentaje de metilación.

6. Análisis de resultados

En la muestra analizada se identificó la variante *TOR1A_rs1801968* en pacientes, familiares y controles; sin embargo, no se observaron diferencias de su frecuencia al comparar los tres grupos (**Tabla 6**). La frecuencia de la variante en la muestra estudiada fue de 0.89 para el alelo C de referencia y de 0.11 para el alelo alternativo G; lo que resulta muy similar a lo reportado en bases de datos públicas para la población mexicana, en donde $f(C)=0.90$ y $f(A)=0.10$ (NCBI, 2023).

En las muestras de familiares se identificó quiénes eran portadores de las variantes *TOR1A_delGAG* y *TOR1A_rs1801968*. Estudios previos han documentado un aumento significativo en la frecuencia del alelo H en los portadores asintomáticos de la delección GAG en relación con los portadores sintomáticos (Risch *et al.*, 2007); sin embargo, en el caso de la muestra estudiada únicamente 4 de los 5 portadores de la delGAG que eran asintomáticos presentaban el alelo H; mientras que 10 de los 11 portadores sintomáticos presentaban el alelo H. También se pudo determinar la fase en que se encontraba la variante *TOR1A_rs1801968* con respecto a la delGAG. Previamente se había reportado un efecto altamente protector del alelo H en trans con la delección GAG; y hubo evidencia sugestiva de que el alelo D216 en cis es necesario para que la enfermedad sea penetrante (Ozelius *et al.*, 2011); sin embargo en la muestra estudiada; se encontraron únicamente portadores del alelo H en cis con la delección GAG; por otro lado, en los portadores del alelo D identificados, ambos se encontraban con segregación en *trans* con respecto a la delGAG; uno de ellos resultó estar afectado (DYT-99);

mientras que el otro no (DYT-135). Esto apoya la existencia de otros factores que influyen en la penetrancia de la enfermedad.

Con respecto al análisis de metilación del promotor del gen *TOR1A* para evaluar su posible efecto en la penetrancia de la enfermedad, en la comparación de los niveles de metilación de los sitios CpG entre los diferentes grupos estudiados, se obtuvieron diferencias significativas al comparar dentro del grupo DYT a los pacientes vs familiares (**Tabla 8**); estas diferencias se identificaron al comparar el porcentaje total de metilación, así como en 7 sitios CpG evaluados.

También se identificaron diferencias en el nivel de metilación de la región promotora al comparar pacientes vs portadores asintomáticos (FPA), tanto en el nivel total de metilación como en los sitios CpG_1 y CpG_3; además en la **Figura 18** se puede observar como los pacientes presentan mayores niveles de metilación que los portadores asintomáticos; lo que podría estar relacionado con la penetrancia presente en esta patología y que podría determinar la presencia o ausencia de síntomas clínicos.

Finalmente, al comparar longitudinalmente los niveles de metilación en las muestras de ADN de los pacientes DYT-99 y DYT-123 en dos tiempos para explorar potenciales cambios epigenéticos durante el progreso de la enfermedad (a siete y a un año, respectivamente), no se observaron diferencias estadísticas. Sin embargo, en ambos casos puede observarse que ha medida que avanza el tiempo existe una disminución en los niveles de metilación (**Figura 19**). El tamaño de la muestra analizado longitudinalmente no permite hacer análisis ni conclusiones de esto.

7. Conclusiones

Se lograron identificar adecuadamente a los portadores de las variantes *TOR1A_rs1801968* y delGAG en la muestra analizada; y gracias al análisis de muestras de familiares de los pacientes con diagnóstico de *DYT-TOR1A* se realizaron genealogías que permitieron identificar la fase de la segregación *cis* o *trans* de las variantes estudiadas que presentaban los portadores. Las diferencias

observadas al comparar los niveles de metilación de la región promotora pueden brindar una explicación al fenómeno de penetrancia presentado en esta patología.

VIII. Referencias bibliográficas

- Albanese, A., Asmus, F., Bhatia, K. P., Elia, A. E., Elibol, B., Filippini, G., Gasser, T., Krauss, J. K., Nardocci, N., Newton, A., & Valls-Solé, J. (2011). EFNS guidelines on diagnosis and treatment of primary dystonias. *European journal of neurology*, *18*(1), 5–18. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.03042.x>
- 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., y Teller, J.K. (2013). Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Mov Disord* *28*: 863-873. <https://doi.org/10.1002/mds.25475>.
- Applied Biosystems. (2010). Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Getting Started Guide for Genotyping Experiments. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4387784c.pdf>
- Carbon, M., & Eidelberg, D. (2009). Abnormal structure-function relationships in hereditary dystonia. *Neuroscience*, *164*(1), 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.12.041>
- Charlesworth, G., Bhatia, K. P., & Wood, N. W. (2013). The genetics of dystonia: new twists in an old tale. *Brain: a journal of neurology*, *136*: (7), 2017–2037. <https://doi.org/10.1093/brain/awt138>
- Fan, Y., Si, Z., Wang, L., & Zhang, L. (2023). DYT-TOR1A dystonia: an update on pathogenesis and treatment. *Frontiers in neuroscience*, *17*: 1216929. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1216929>.
- Fatemi, M., Pao, M. M., Jeong, S., Gal-Yam, E. N., Egger, G., Weisenberger, D. J., y Jones, P. A. (2005). Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level. *Nucleic acids research*, *33*(20), e176. <https://doi.org/10.1093/nar/gni180>

- Gardiner, G. M., Frommer, M. (1987). CpG Islands in Vertebrate Genomes. *J. Mol. Biol.* 196: 261–282, [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90689-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90689-9).
- Grütz, K., Seibler, P., Weissbach, A. (2017). Faithful SGCE imprinting in iPSC-derived cortical neurons: an endogenous cellular model of myoclonus-dystonia. *Sci Rep* 7: 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep41156>.
- Hamid, M., Rahnavard, S. (2020). Quantitative evaluation of DYT1 promoter methylation in dystonia patients. *Health Biotechnology and Biopharma (HBB)*, 4(3), 19-27. <https://doi: 10.22034/HBB.2020.15>
- Hettich, J., Ryan, S.D., de Souza, O.N., Saraiva Macedo Timmers, L.F., Tsai, S., Atai, N.A., da Hora, C.C., Zhang, X., Kothary, R., Snapp, E., Ericsson, M., Grundmann, K., Breakefield, X.O. and Nery, F.C. (2014). Biochemical and Cellular Analysis of Human Variants of the DYT1 Dystonia Protein, TorsinA/TOR1A. *Human Mutation*, 35: 1101-1113. <https://doi.org/10.1002/humu.22602>
- Kamm, C., Fischer, H., Garavaglia, B., Kullmann, S., Sharma, M., Schrader, C., Grundmann, K., Klein, C., Borggraefe, I., Lobsien, E., Kupsch, A., Nardocci, N., & Gasser, T. (2008). Susceptibility to DYT1 dystonia in European patients is modified by the D216H polymorphism. *Neurology*, 70(23), 2261–2262. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000313838.05734.8a>
- Kock, N., Naismith, T. V., Boston, H. E., Ozelius, L. J., Corey, D. P., Breakefield, X. O., & Hanson, P. I. (2006). Effects of genetic variations in the dystonia protein torsinA: identification of polymorphism at residue 216 as protein modifier. *Human molecular genetics*, 15(8), 1355–1364. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl055>
- Krause, C., Schaake, S., Grütz, K., Sievert, H., Reyes, C. J., König, I. R., Laabs, B. H., Jamora, R. D., Rosales, R. L., Diesta, C. C. E., Pozojevic, J., Gemoll, T., Westenberger, A., Kaiser, F. J., Klein, C., & Kirchner, H. (2020). DNA Methylation as a Potential Molecular Mechanism in X-linked Dystonia-

Parkinsonism. *Movement disorders* : official journal of the Movement Disorder Society, 35(12), 2220–2229. <https://doi.org/10.1002/mds.28239>

Movement disorders (s/f). Unified Dystonia Rating Scale (UDRS). [Movementdisorders.org](https://www.movementdisorders.org). Recuperado el 4 de noviembre de 2022, de <https://www.movementdisorders.org/MDS/MDS-RatingScales/Unified-Dystonia-Rating-Scale-UDRS-.html>

NCBI. (s/f). Gene. TOR1A torsin family 1 member A [Homo sapiens (human)] Recuperado el 15 de febrero de 2024, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1861>

NCBI. (s/f). SNP. rs1801968 Recuperado el 15 de diciembre de 2023, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1801968>

Ozelius, L. J., Hewett, J. W., Page, C. E., Bressman, S. B., Kramer, P. L., Shalish, C., de Leon, D., Brin, M. F., Raymond, D., Corey, D. P., Fahn, S., Risch, N. J., Buckler, A. J., Gusella, J. F., & Breakefield, X. O. (1997). The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. *Nature genetics*, 17(1), 40–48. <https://doi.org/10.1038/ng0997-40>

Ozelius, L. J., y Bressman, S. B. (2011). Genetic and clinical features of primary torsion dystonia. *Neurobiology of Disease*, 42(2), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.12.012>

Pajares, M. J., Palanca, B.C., Urtasun, R., Alemany, C. E., Lahoz, A., y Sandoval, J. (2021). Methods for analysis of specific DNA methylation status. *Methods* 187: 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.06.021>

Park, J., Damrauer, S. M., Baras, A., Reid, J. G., Overton, J. D., y Gonzalez-Alegre, P. (2019). Epidemiology of DYT1 dystonia: Estimating prevalence via genetic ascertainment. *Neurology. Genetics*, 5(5), e358. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000358>

QIAGEN. (2013). PyroMark® Q24 Advanced User Manual. <https://www.geneious.mx/catalogos/PyroMark-Q24-Advanced-User-Manual.pdf>

QIAGEN. (2020). EpiTect® Bisulfite Handbook. <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=f6e8659a-8c2f-49b6-8ac3-5dbdc99589cd&lang=en>

Risch, N.J., Bressman S.B., Senthil, G., Ozelius, L.J. (2007). Intragenic Cis and Trans modification of genetic susceptibility in DYT1 torsion dystonia. *Am J Hum Genet.* 80:1188-93. <https://doi.org/10.1086/518427>.

Ronaghi, M., Uhlén, M., y Nyrén, P. (1998). A sequencing method based on Real-time pyrophosphate. *Science* (281), 363–365. <https://doi.org/10.1126/science.281.5375.363>

Schübeler, D. (2015). Function and information content of DNA methylation. *Nature* 517: 321–326. <https://doi.org/10.1038/nature14192>.

Sciamanna, G., El Atiallah, I., Montanari, M., y Pisani, A. (2022). Plasticity, genetics and epigenetics in dystonia: An update. *Handbook of Clinical Neurology.* 184: 199–206. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819410-2.00011-4>

Smith, Z. D., y Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature reviews. Genetics,* 14(3), 204–220. <https://doi.org/10.1038/nrg3354>

Thermo Fisher Scientific Inc. (2017). TaqMan® SNP Genotyping Assays USER GUIDE. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0009593_TaqManSNP_UG.pdf

^aThermo Fisher Scientific Inc^a. US (s/f). PCR basics. Recuperado el 19 de febrero de 2024 de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html>

^bThermo Fisher Scientific Inc. US (s/f). Essentials of real-time PCR. Recuperado el 19 de febrero de 2024 de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html>

^cThermo Fisher Scientific Inc.c US (s/f). How TaqMan assays work. Recuperado el 19 de febrero de 2024 de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>

^dThermo Fisher Scientific Inc.d US (s/f). What is Sanger sequencing?. Recuperado el 19 de febrero de 2024 de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/sequencing/sequencing-learning-center/capillary-electrophoresis-information/what-is-sanger-sequencing.html>

^eThermo Fisher Scientific Inc. eUS (s/f). How to Conduct Sanger Sequencing. Recuperado el 19 de febrero de 2024 de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/sequencing/sequencing-learning-center/capillary-electrophoresis-information/how-conduct-fragment-analysis0.html>

Von Känel, T., y Huber, A. R. (2013). DNA methylation analysis. *Swiss medical weekly*, 143: 137-99. <https://doi.org/10.4414/smw.2013.13799>.

IX. Anexos

A. Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado.



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ

F01-CEI-01

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Le invitamos a participar en este proyecto de investigación desarrollado por investigadores del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía y aprobado por los Comités en Materia de Investigación para la Salud incluyendo el Comité de Investigación y el Comité de Ética en Investigación.

Registro	Título
161/22	Niveles de metilación de las regiones promotoras de los genes <i>TOR1A</i> y <i>THAP1</i> en pacientes mexicanos con distonía.

Por favor, lea esta forma informativa con cuidado. Tómese el tiempo para hacer todas las preguntas que desee. El personal del estudio le explicará cualquier término o información que no comprenda con claridad.

El propósito de esta investigación es:

Identificar los posibles mecanismos asociados a la distonía por variantes en el gen *TOR1A* (debido a que no todos aquellos individuos portadores de variantes patogénicas en este gen desarrollan manifestaciones); además de que el gen *TOR1A* muestra una interrelación importante para la expresión de otro gen denominado *THAP1*, el cual también puede asociarse con el desarrollo de distonía. La distonía por variantes en el gen *TOR1A* ha sido descrita en diversas partes del mundo y en todos los casos se menciona que el desarrollo de manifestaciones es muy variable entre los sujetos, inclusive en personas de una misma familia.

I. INTRODUCCIÓN

Un Comité de Ética en Investigación (CEI) y un Comité de Investigación (CI) con revisión independiente responsable por la conducta ética y los principios científicos en este centro de investigación han aprobado este estudio.

Usted está siendo invitado a participar en este estudio de investigación clínica donde se realizara una evaluación de los niveles de metilación de las regiones promotoras de los genes *TOR1A* y *THAP1* con la finalidad de identificar si hay diferencias entre sujetos afectados por distonía con la presencia de variantes patogénicas en el gen *TOR1A*, sujetos (o familiares) sin distonía y con la presencia de variantes patogénicas en el gen *TOR1A*, y sujetos sin distonía y sin variantes patogénicas en el gen *TOR1A*. Esto se está en investigación debido a

Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado continuación.

que aún no se han determinado cuales son los factores que determinan que sujetos si y que sujetos no desarrollan distonía.

Antes de decidir si usted desearía participar en este estudio, por favor, lea esta información cuidadosamente y discútala con su médico y a cualquier persona que usted prefiera antes de aceptar participar. Esto explica el estudio y lo que se espera que usted haga durante el mismo.

La participación en este estudio es completamente voluntaria; usted no está obligado a formar parte de este. Su tratamiento y actitud de su doctor hacia usted no se verán afectados en el caso de decidir que no desea formar parte de este estudio. La negativa a participar no afectará cualquier beneficio para el cual usted de otra forma tenga derecho. Usted también podrá retirarse una vez enrolado durante el estudio si es que así lo desea, con las mismas implicaciones mencionadas previamente.

Se le está solicitando considerar su participación en este estudio por que ha sido diagnosticado con distonía genética por variantes en los genes *TORIA* y *THAPI*, la cual se caracteriza por tener posturas sostenidas de una o diversas regiones corporales y puede asociarse a alteraciones en el movimiento.

II. PARTICIPANTES

En este estudio sólo podrán participar los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión:

Pacientes con diagnóstico de distonía por variantes patogénicas en el gen <i>TORIA</i> .
Familiares u otros sujetos sanos portadores de variantes patogénicas en el gen <i>TORIA</i> .
Sujetos sanos no portadores de variantes patogénicas (controles), que serán pareados por edad y sexo que acepten participar voluntariamente en el protocolo.

En este estudio no podrán participar los pacientes que cumplan con los criterios de exclusión:

Pacientes con distonía y variantes patogénicas en el gen <i>TORIA</i> , familiares/sujetos portadores de variantes sin distonía, o bien sujetos controles que no cuenten con todas las evaluaciones propuestas.

III. PROPÓSITO DEL ESTUDIO

Con el protocolo de investigación se pretende evaluar los niveles de metilación de las regiones promotoras de los genes *TORIA* y *THAPI* en: personas con distonía con la presencia de las variantes patogénicas en el gen *TORIA*, sujetos

Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado continuación.

sin distonía y con la presencia de las variantes patogénicas en el gen *TOR1A*, y sujetos sin manifestaciones y sin variantes patogénicas en el gen *TOR1A*; para poder indentificar si existe un aprón diferencial que ayude a explicar porque unos estan afectados y otros no.

IV. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Aproximadamente 15 individuos con distonía con la presencia de las variantes genéticas, 15 individuos sin distonía y con la presencia de las variantes genéticas, y 15 individuos sin distonía y sin variantes genéticas formaran parte de este estudio en el transcurso de 24 meses.

Las personas seleccionados deberán tener el diagnóstico de distonía con la presencia de las variantes patogénicas en el gen *TOR1A*. Todos serán invitados a participar, se les realizaran los estudios de niveles de metilación de las regiones promotoras de los genes *TOR1A* y *THAP1*. Con la finalidad de establecer un patrón diferencial de metilación de las regiones promotoras. Una vez cubiertos los criterios de inclusión de este protocolo se programara el paciente para una evaluación clínica y la toma de una muestra de sangre.

V. DESCRIPCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

Durante la primera visita se registrarán los datos clínicos, incluyendo la edad, género, condiciones médicas actuales, uso de medicamentos, confirmar el diagnóstico de distonía con la presencia de las variantes patogénicas en el gen *TOR1A*. El médico del estudio o su asistente revisarán sus signos vitales, realizarán un examen físico completo y aplicaran la *escala unificada de rangos para distonía* (UDRS, por sus siglas en inglés). Posteriormente se realizará una toma de sangre perfiérica, alrededor de 10 a 12 mL.

VI. COSTOS RELACIONADOS CON EL ESTUDIO

Este estudio no cuenta con financiamiento externo; sin embargo los sujetos considerados a participar **NO** deberán de pagar el costo. Solo aquellos estudios que se consideren parte del abordaje o manejo rutinario de su enfermedad podrán ser pagados por usted.

VII. RIESGOS O INCONVENIENCIAS RAZONABLES Y PREVISIBLES

Las posibles complicaciones asociadas al procedimiento pudieran ser: molestia o dolor en la zona de extracción, posterior a la misma puede haber dolor

Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado continuación.

residual y leve inflamación de la región manipulada, que se eliminará tras unas horas. Algunos de estos síntomas y signos pueden ser tratados sintomáticamente con fomentos de agua fría o hielo. En caso de persistir con dolor puede tomar algún analgésico de uso regular en su persona, o bien comunicarse con los encargados de la investigación a los teléfonos que se indican más adelante.

VIII. POSIBLES BENEFICIOS ESPERADOS

Se podría esperar encontrar un patrón diferencial en las regiones promotoras de los genes *TOR1A* y *THAP1* que ayude a predecir que sujetos tienen el riesgo de desarrollar distonía. Esto podría dar las bases para que a futuro se puedan desarrollar terapéuticas que modifiquen la metilación y se evite el desarrollo de manifestaciones.

IX. EMBARAZO Y LACTANCIA, ANTICONCEPCIÓN.

Debido a que no se realizará ninguna intervención experimental se podrán incluir personas con embarazo o en lactancia.

X. PARTICIPACIÓN – RETIRO DEL ESTUDIO

Usted puede voluntariamente detener su participación en este estudio en cualquier momento. Si usted elige retirar su consentimiento, necesitará informar a su doctor del estudio inmediatamente. Usted puede discutir con su médico otras opciones de tratamiento.

Pueden existir circunstancias en las que su doctor la retirará del estudio aunque usted no lo desee. Estas razones pueden incluir situaciones que pongan en peligro la vida, porque el protocolo termine prematuramente, o porque no asista a las visitas de seguimiento.

Con el objetivo de que continúe bajo supervisión en este estudio, usted debe aceptar estas evaluaciones y seguir las instrucciones de su doctor. Al no hacer esto, su doctor puede retirarlo del estudio debido a que la continuidad de su participación puede no ser lo más conveniente para usted.

Si el médico del estudio no es su médico de cabecera, se recomienda que el médico del estudio informe a su médico personal sobre su participación en el estudio si usted así lo desea. Si usted tiene alguna preocupación sobre esto, por favor platíquelo con el personal del estudio.

SU tratamiento y la actitud del neurólogo hacia usted no se verán afectadas de ninguna manera en caso de que usted decida no formar parte del estudio. La

Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado continuación.

negativa a participar no afectará cualquier beneficio para el cual usted de otra forma tenga derecho.

Puede solicitar la corrección de sus datos o que sus datos se eliminen de nuestras bases o retirar su consentimiento para su uso. En cualquiera de estos casos le pedimos dirigirse a las siguientes direcciones de correo: miguel.ramirez@inn.edu.mx y nancy.monroy@inn.edu.mx.

XI. RESPONSABILIDADES DEL PACIENTE

Mientras está involucrado en este estudio, usted deberá acudir a las consultas de seguimiento y a realizarse las valoraciones planeadas para el mismo. Para cualquier enfermedad o lesión, usted deberá contactar al investigador inmediatamente o en cualquier situación de emergencia buscar el cuidado apropiado.

XII. COMPENSACIONES POR LESIÓN

No se le cobrará por ninguna evaluación extra por parte del investigador principal relacionada con el proyecto de investigación. No habrá costos adicionales para usted por su participación en este estudio. Se le proporcionará tratamiento médico por cualquier lesión física que usted sufra y que se encuentre relacionado con la investigación, de acuerdo con los recursos del instituto y la red de salud de la Secretaría de Salud.

El término "lesión directamente relacionada con la investigación" quiere decir que su lesión física fue causada directamente por los procedimientos realizados apropiadamente, requeridos por el estudio que sean diferentes del procedimiento estándar que usted hubiera recibido si no hubiera participado en el estudio.

En el caso de lesión directamente relacionada con la investigación, el tratamiento médico necesario, dentro de los estándares de tratamiento establecidos, será proporcionado para ayudarlo en la recuperación de dicho daño. El tratamiento por daños relacionados con la investigación puede incluir pruebas de laboratorio, rayos X, y otros procedimientos utilizados en el diagnóstico y tratamiento. Esto a través de los recursos del instituto y la red de salud de la SSA. Ninguna otra compensación será cubierta. Usted debe notificar al médico del estudio inmediatamente, de cualquier lesión relacionada con la investigación. El médico notificará a la Dirección de Investigación del instituto de esta situación. Este protocolo NO cuenta con financiamiento económico.

Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado continuación.

XIII. CONFIDENCIALIDAD

Los datos de su participación permanecerán con carácter estrictamente confidencial en el centro de investigación. Sin embargo, serán examinados por todas las personas relacionadas con el protocolo de investigación y/o quienes sean nombradas para su análisis, incluyendo a los representantes de las autoridades de salud de México y otras agencias reguladoras con propósitos de inspección.

Toda la información obtenida será estrictamente confidencial y no se revelará ninguna información que pueda identificarlo. Su nombre o alguna identificación de su persona no serán usados en ninguno de los estudios. Por ningún motivo identificaremos tu nombre en ningún material.

En este estudio se han adoptado todas las medidas necesarias para proteger la privacidad e intimidad del paciente. También se utilizará una plataforma en línea segura y confidencial, que permitirá coleccionar de forma de-identificada.

Si se publica la información obtenida de este estudio, el reporte será redactado de modo tal que nadie pueda identificar sus datos personales e identidad, salvo que dicha información sea requerida oficialmente por alguna autoridad mexicana o del extranjero.

XIV. INFORMACIÓN DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL

Si usted tiene alguna pregunta acerca de esta información u otra relacionada con el proyecto de investigación favor de contactar al investigadores principales: el Dr. Miguel Ángel Ramírez García y la Dra. Nancy Monroy Jaramillo en los teléfonos: 55 5606 3822, Ext: 2018, o a los Email: miguel.ramirez@innn.edu.mx y nancy.monroy@innn.edu.mx.

Si desea más información respecto a sus derechos como participante de este estudio, o discutir posibles lesiones como consecuencia de este estudio, puede comunicarse con o si tiene preguntas sobre sus derechos como participante contacte al Presidente del Comité de Ética del INNN el Dr. Pablo León Ortiz (comite.etica@innn.edu.mx) o al teléfono 56063822 Ext. 5027 o 1080.

Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado continuación.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

He leído y comprendido la información proporcionada para el paciente sobre el presente estudio, en particular las secciones que describen el propósito, descripción y procedimientos del estudio, los riesgos y beneficios previstos que van a utilizarse sobre las cuales he tenido de hacer preguntas y he comprendido todas las respuestas. Otorgo mi consentimiento de manera libre y voluntaria para participar en el estudio "Niveles de metilación de las regiones promotoras de los genes *TOR1A* y *THAP1* en pacientes mexicanos con distonía". Estoy enterado de que puedo retirarme del estudio en cualquier momento sin que se me someta a ningún tipo de penalización. Los datos de mi participación permanecerán con carácter estrictamente confidencial en el centro de investigación. Sin embargo, estoy de acuerdo en que sean examinados y utilizados por todas las personas relacionadas con el proyecto de investigación, incluyendo las agencias reguladoras, incluso si abandono o me retiro anticipadamente del estudio. Si se publica la información obtenida de este estudio, el reporte será redactado de modo tal que nadie pueda identificar mis datos personales e identidad.

- He leído este formulario y se me ha explicado el estudio de investigación.
- Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas, y mis preguntas fueron respondidas.
- Se me ha informado a quién debo llamar si tengo más preguntas.
- Acepto participar en el estudio de investigación descrito arriba.
- Recibiré una copia de este formulario después de firmarlo.

No firme este formato a menos que usted haya tenido la oportunidad de hacer preguntas y de que haya obtenido respuestas satisfactorias a todas sus preguntas.

¿Acepta los términos anteriores?

Estoy de acuerdo _____ No estoy de acuerdo _____

¿Acepta que tus datos personales sean tratados como se describió anteriormente?

Estoy de acuerdo _____ No estoy de acuerdo _____

Nombre del sujeto

Firma

Fecha y Hora

Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado continuación.

Nombre del Representante Legal Firma Fecha y
Hora

Nombre del quien obtuvo el
Consentimiento Informado Firma Fecha y
Hora

Nombre del testigo 1 Firma Fecha y
Hora
Relación con el participante: _____
Dirección: _____

Nombre del testigo 2 Firma Fecha y Hora
Relación con el participante: _____
Dirección: _____

Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado continuación.

Hoja de Recolección de Datos Protocolo INNN 161/22

Nombre: _____ Fecha: _____

Edad: _____ Fecha de Nacimiento: _____

Lugar de Origen: _____ Lugar de Residencia: _____

Usted tiene el diagnóstico de Disonía: Si No Fecha del Diagnóstico: _____

¿Qué forma de presentación de Disonía presenta:

Focal: _____

Segmentaria: _____

Multifocal: _____

Generalizada: _____

¿Cuál es su tratamiento?

Usted es familiar de un paciente con disonía: Si No

Si usted es familiar, ¿qué parentesco tiene con el afectado de la familia?

Familiar de 1er grado (Padre Hermano Hijo).

Familiar de 2o grado (Abuelo Nieto Tío/ía Sobrino Medio hermano)

Familiar de 3er grado (Primos hermanos Bisabuelos Tíos abuelos Sobrinos nietos Bisnieto)

Usted participará como sujeto control sano: Si No

¿Padece usted algún trastorno neurológico o psiquiátrico? Si No

¿cuál es su diagnóstico? _____

¿Cuál es su tratamiento?

B. Anexo 2. Unified Dystonia Rating Scale (UDRS).

<i>Unified Dystonia Rating Scale (UDRS)</i>	
Factor/area	Criteria
Duration	
0	None
0.5	Occasional (<25% of the time); predominantly submaximal
1.0	Occasional (<25% of the time); predominantly maximal
1.5	Intermittent (25–50% of the time); predominantly submaximal
2.0	Intermittent (25–50% of the time); predominantly maximal
2.5	Frequent (50–75% of the time); predominantly submaximal
3.0	Frequent (50–75% of the time); predominantly maximal
3.5	Constant (>75% of the time); predominantly submaximal
4.0	Constant (>75% of the time); predominantly maximal
Motor severity	
Eyes and upper face	
0	None
1	Mild: increased blinking or slight forehead wrinkling ($\leq 25\%$ maximal intensity)
2	Moderate: eye closure without squeezing or pronounced forehead wrinkling ($>25\%$ but $\leq 50\%$ maximal intensity)
3	Severe: eye closure with squeezing, able to open eyes within 10 seconds or marked forehead wrinkling ($>50\%$ but $\leq 75\%$ maximal intensity)
4	Extreme: eye closure with squeezing, unable to open eyes within 10 seconds or intense forehead wrinkling ($>75\%$ maximal intensity)
Lower face	
0	None
1	Mild: grimacing of lower face with minimal distortion of mouth ($\leq 25\%$ maximal)
2	Moderate: grimacing of lower face with moderate distortion of mouth ($>25\%$ but $\leq 50\%$ maximal)
3	Severe: marked grimacing with severe distortion of mouth ($>50\%$ but $\leq 75\%$ maximal)
4	Extreme: intense grimacing with extreme distortion of mouth ($>75\%$ maximal)
Jaw and tongue	
0	None
1	Mild: jaw opening or tongue protrusion $\leq 25\%$ of possible range or forced jaw clenching without bruxism
2	Moderate: jaw opening or tongue protrusion $>25\%$ but $\leq 50\%$ of possible range or forced jaw clenching with mild bruxism secondary to dystonia
3	Severe: jaw opening and/or tongue protrusion $>50\%$ but $\leq 75\%$ of possible range or forced jaw clenching with pronounced bruxism secondary to dystonia
4	Extreme: jaw opening or tongue protrusion $>75\%$ of possible range or forced jaw clenching with inability to open mouth
Larynx	
0	None
1	Mild: barely detectable hoarseness or choked voice or occasional voice breaks
2	Moderate: obvious hoarseness or choked voice or frequent voice breaks
3	Severe: marked hoarseness or choked voice or continuous voice breaks
4	Extreme: unable to vocalize
Neck	
0	None
1	Mild: movement of head from neutral position $\leq 25\%$ of possible normal range
2	Moderate: movement of head from neutral position $>25\%$ but $\leq 50\%$ of possible normal range
3	Severe: movement of head from neutral position $>50\%$ but $\leq 75\%$ of possible normal range
4	Extreme: movement of head from neutral position $>75\%$ of possible normal range

Anexo 2. Unified Dystonia Rating Scale (UDRS) continuación.

Unified Dystonia Rating Scale (UDRS)

Factor/area	Criteria
Shoulder and proximal arm (right and left)	
0	None
1	Mild: movement of shoulder or upper arm $\leq 25\%$ of possible normal range
2	Moderate: movement of shoulder or upper arm $>25\%$ but $\leq 50\%$ of possible normal range
3	Severe: movement of shoulder or upper arm $>50\%$ but $\leq 75\%$ of possible normal range
4	Extreme: movement of shoulder or upper arm $>75\%$ of possible normal range
Distal arm and hand including elbow (right and left)	
0	None
1	Mild: movement of distal arm or hand $\leq 25\%$ of possible normal range
2	Moderate: movement of distal arm or hand $>25\%$ but $\leq 50\%$ of possible normal range
3	Severe: movement of distal arm or hand $>50\%$ but $\leq 75\%$ of possible normal range
4	Extreme: movement of distal arm or hand $>75\%$ of possible normal range
Pelvis and proximal leg (right and left)	
0	None
1	Mild: tilting of pelvis or movement of proximal leg or hip $\leq 25\%$ of possible normal range
2	Moderate: tilting of pelvis or movement of proximal leg or hip $>25\%$ but $\leq 50\%$ of possible normal range
3	Severe: tilting of pelvis or movement of proximal leg or hip $>50\%$ but $\leq 75\%$ of possible normal range
4	Extreme: tilting of pelvis or movement of proximal leg or hip $>75\%$ of possible normal range
Distal leg and foot including knee (right and left)	
0	None
1	Mild: movements of distal leg or foot $\leq 25\%$ of possible normal range
2	Moderate: movements of distal leg or foot $>25\%$ but $\leq 50\%$ of possible normal range
3	Severe: movements of distal leg or foot $>50\%$ but $\leq 75\%$ of possible normal range
4	Extreme: movements of distal leg or foot $>75\%$ of possible normal range
Trunk	
0	None
1	Mild: bending of trunk $\leq 25\%$ of possible normal range
2	Moderate: bending of trunk $>25\%$ but $\leq 50\%$ of possible normal range
3	Severe: bending of trunk $>50\%$ but $\leq 75\%$ of possible normal range
4	Extreme: bending of trunk $>75\%$ of possible normal range