



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Académico Profesional de Genética y Biotecnología

**Diagnóstico molecular para distonía primaria DYT1:
diseño basado en PCR para la mutación
904_906delGAG/907_909delGAG en el gen *torsina1a***

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Miguel Alfredo Martín INCA MARTÍNEZ

Lima, Perú

2014

RESUMEN

Introducción. La distonía primaria de inicio temprano o DYT1 es una enfermedad de herencia dominante, producida en la mayoría de casos, por una deleción en el gen TORSINA1A. El diagnóstico molecular actual de DYT1 se basa en PCR-RFLP. En el Perú, hasta el momento, ninguna institución de salud pública o privada realiza el diagnóstico molecular de DYT1. **Objetivo.** Desarrollar una técnica de PCR para identificar la mutación 904_906delGAG/907_909delGAG del gen TORSINA1A. **Métodos.** Utilizando 5 muestras de personas saludables (controles negativos) y 2 muestras de pacientes DYT1 (controles positivos). Se estandarizó dos protocolos de PCR convencional, uno con 4 y otro con 2 cebadores. Los cebadores fueron diseñados con el programa AmplifX. **Resultados.** Los ensayos in vitro revelaron una baja especificidad de los cebadores 3 y 4 en el primer protocolo. El protocolo con 2 cebadores, mostró una banda adicional con un patrón de migración semejante a un fragmento de 250 pb, solo presente en controles positivos, y consistente con los resultados de PCR-RFLP, técnica estándar de oro para identificar esta deleción. Utilizando el protocolo PCR con dos cebadores, se identificó la deleción 904_906delGAG/907_909delGAG en 5 de 25 pacientes (20%) con sospecha de DYT1 atendidos en el servicio de Neurogenética del INCN. **Conclusiones.** Un protocolo basado en PCR convencional con dos cebadores permite discriminar la presencia de la mutación 904_906delGAG/907_909delGAG del gen TORSINA1A vinculada a DYT1. Estudios posteriores que analicen la banda adicional obtenida con los cebadores 1 y 2, permitirían validar este procedimiento para diagnóstico en la práctica clínica.

ABSTRACT

Introduction. Primary early onset dystonia or DYT1 is a dominantly inherited disorder, caused in most cases by a deletion in the gene TORSINA1A. The current DYT1 molecular diagnosis is based on PCR-RFLP. Up to now, no public or private health center offer DYT1 molecular diagnosis in Peru. **Objective.** To standardize a PCR protocol for identifying the 904_906delGAG/ 907_909delGAG mutation in TORSINA1A gene. **Methods.** We used 5 samples of healthy individuals (negative controls) and 2 samples from DYT1 patients (positive controls). Two different PCR protocols were standardize, the first one using 4 primers and the second one using just two primers. All four primers were designed with the AmplifX program. **Results.** In vitro assays revealed low specificity of the primers 3 and 4 within the first protocol. The second protocol, based on 2 primers, showed an additional band with similar migration pattern to a 250 bp fragment, only visible in positive controls, consistent with the results of PCR-RFLP, gold standard technique for genotyping this deletion. Using the PCR protocol with two primers, the deletion 904_906delGAG / 907_909delGAG was identified in 5 out of 25 patients (20%) with suspected DYT1 followed at the Neurogenetic Research Center. **Conclusions.** A conventional PCR protocol using two primers is able to discriminate the presence of the 904_906delGAG / 907_909delGAG mutation in the TORSINA1A gene, causal mutation of DYT1 dystonia. Further studies analyzing the additional band, obtained with primers 1 and 2, and might validate this protocol for diagnostic purposes in clinical practice.