



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Fundación Hospital Nuestra Señora de La Luz, I.A.P.

Protocolo de Investigación.

## **Determinación de Polimorfismos en el Locus rs1182 del Gen DYT1 en Blefaroespasma Esencial Benigno**

**TESIS**  
**que para obtener el título de:**  
**CIRUJANO OFTALMÓLOGO**  
**presenta:**

**Dr. Mario Vera González**

**Tutor Interno:** Dr. Gerardo Graue Moreno<sup>a</sup>

**Investigadores asociados:** Dr. Hector Javier Pérez Cano<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Médico cirujano oftalmólogo. Jefe del departamento de Órbita, Párpados y Vías Lagrimales. Fundación Hospital Nuestra Señora de La Luz. Ciudad de México. Teléfono: 55 5128 1140

<sup>b</sup>Doctor en Ciencias. Centro de Investigación Biomédica. Fundación Hospital Nuestra Señora de La Luz. Ciudad de México. Teléfono: (55) 5282 4343.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

DR. ALEJANDRO BABAYÁN SOSA  
PROFESOR TITULAR DE LA UNAM

---

DR. ÓSCAR BACA LOZADA  
PROFESOR ADJUNTO

---

DRA. ADRIANA SAUCEDO CASTILLO  
PROFESOR ADJUNTO / JEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

---

DR. JAIME LOZANO ALCÁZAR  
DIRECTOR MÉDICO

---

DRA. STEPHANIE VOORDUIN RAMOS  
SUBJEFE DE ENSEÑANZA

---

DR. GERARDO GRAUE MORENO  
ASESOR DE TESIS

---

DR. HECTOR JAVIER PEREZ CANO  
ASESOR DE TESIS

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia. A mi mamá, a mi papá y mi hermano. Por su apoyo incondicional. Por aguantar mi estrés y mi ausencia. Nada sería posible sin ustedes y al mismo tiempo todo es para ustedes.

A Lari, que después de encontrarnos en el sitio menos esperado se ha vuelto una parte esencial de mi vida. Por sus ánimos, sus porras, su apoyo en los peores momentos y obstáculos. Por todos los desvelos juntos. Te amo.

A mis grandes amigos de la residencia y la vida. Lucía, Adriana, Karen, Gasca, Peña, Orlando. Gracias infinitas por haber hecho de este viaje uno más ameno, lleno de aprendizajes, risas, experiencias. Por haber llegado juntos al final de este viaje.

Al Dr. Héctor Pérez Cano. Por **creer** en mi. Por ayudarme día tras día en el Centro de Investigación Biomédica. Por su tiempo y asesoría invertida. Por siempre leer mis mensajes y estar al pendiente. Por ayudarme a arreglar el secuenciador con cinta de teflón.

A la Dra. Adriana Saucedo. Por su paciencia y por creer en mi. Por todos los empujones que fueron necesarios para ayudarme a lograr llegar a este punto.

Al Dr. Gerardo Graue. Por ser un ser un gran ejemplo a seguir en mi vida profesional. Por enseñarme el amor a la oculoplástica. Por su asesoría y la atención invertida en este trabajo.

A la Dra. Regina Velasco. Por creer en mi y brindarme su gran apoyo incondicional en tiempos difíciles.

A todos y cada uno de mis maestros en la residencia. Todas sus enseñanzas las llevaré conmigo toda la vida.

A mis compañeros de residencia de distintos años. Por todas sus enseñanzas, compañía y amistad.

Here's to the crazy ones...

# ÍNDICE

I Resumen

II Antecedentes

III Justificación y planteamiento del problema

IV Pregunta de Investigación

V Objetivo general

VI Hipótesis

VII Material y Métodos

VII.1 Método del proyecto de investigación

VII.2 Tipo de estudio

VII.3 Sitio de estudio

VII.4 Periodo de estudio

VII.5 Población de estudio

VII.6 Tamaño de la muestra

VII.7 Criterios de selección

VII.8 Recursos

VII.9 Factibilidad

VII.10 Bioseguridad

VII.11 Cronograma

VII.12 Consideraciones éticas

VIII Resultados

IX Discusión

X Conclusiones

XI Referencias

XII Anexos

## I - RESUMEN

**Introducción.** El blefaroespasma esencial benigno (BEB), es una distonía focal de origen desconocido y con alto impacto en la calidad de vida de los pacientes, en la cual existe una hiperactividad del músculo orbicular y músculos vecinos asociado en la gran mayoría de los pacientes a síntomas oculares y patologías psiquiátricas. Se ha sugerido la presencia de polimorfismos en el locus rs1182 del gen DYT1 como posibles determinantes de la enfermedad clínica.

**Objetivo.** Identificar la presencia de polimorfismos en el locus rs1182 del gen DYT1 en pacientes con diagnóstico de blefaroespasma esencial benigno.

**Material y Métodos.** Estudio prospectivo, transversal y observacional. Se incluyeron pacientes mayores de edad con diagnóstico de blefaroespasma esencial benigno, sin antecedentes de distonías u otras patologías neurológicas. Se realizó, toma de muestra de sangre periférica, extracción de DNA, amplificación del gen DYT1 y detección de polimorfismos en el locus rs1182.

**Resultados.** Se admitieron 6 pacientes al grupo de casos y 6 al grupo de controles. En el análisis de la secuenciación se encontró una frecuencia para el genotipo GG en el grupo de controles de 67% y de 33% para el genotipo GT. En el grupo de casos, se encontró una frecuencia genotípica del 50% para GG y 50% para GT. En ninguna muestra se encontró la presencia del genotipo TT. Se realizó un análisis de la frecuencia alélica, encontrando una frecuencia del 83% para el alelo G y del 17% para el alelo T en el grupo de controles y de 75% para el alelo G y de 25% para el alelo T en el grupo de casos.

**Conclusiones.** Se puede observar que la presencia de un genotipo GG se comporta como un factor protector ante el desarrollo de la enfermedad, podemos sugerir que el genotipo GT es un factor de riesgo para desarrollar blefaroespasma, aún cuando, al analizar la frecuencia alélica, la presencia del alelo T como determinante de la enfermedad no resultó ser estadísticamente significativo, esto debido a las limitaciones del estudio. Es necesario ampliar el tamaño de la muestra para tener una conclusión con mayor poder estadístico.

## **II - ANTECEDENTES**

### **Distonía**

El término distonía se le da al trastorno del movimiento que se caracteriza por contracciones musculares sostenidas o intermitentes que provocan movimientos o posturas a menudo repetitivas y anormales. Ésta inicia o empeora generalmente de manera involuntaria y se asocian a una acción desmedida del músculo (1). Ocupa el tercer lugar de los desórdenes del movimiento, reportándose una prevalencia de 15 a 30 casos por 100,000 en Estados Unidos. Algunos otros artículos mencionan a la distonía asilada con una prevalencia de 732 por 100,000, siendo más frecuente en el sexo femenino con una relación 2:1(2). En México no existen cifras acerca de la prevalencia o incidencia de esta enfermedad. Esta amplia variación en las cifras se puede deber a la falta de criterios para la validación diagnóstica, diagnósticos erróneos o la falta de búsqueda de atención médica para este trastorno.

Las distonías se dividen en dos ejes principales; el primer eje toma en cuenta la edad de presentación, la distribución corporal de los movimientos, el patrón temporal y las presentaciones asociadas y el segundo eje la etiología, es decir si tiene patrón hereditario, adquirido o idiopático (1, 2).

Las presentaciones más comunes son las distonías focales, siendo entre estas las dos más frecuentes: la distonía cervical 69% y el blefaroespasma 17% (3).

## **Blefaroespasma esencial benigno (BEB)**

El blefaroespasma esencial benigno (BEB), es una distonía focal en la cual existe una hiperactividad del músculo orbicular y músculos vecinos como lo son el músculo frontal, el procerus y el corrugador superciliar (4). C.D. Marsden, describió el blefaroespasma hace más de 40 años y desde aquella vez se identificaron características clínicas que continúan vigentes hasta nuestros días, en las que se incluyen: edad de presentación entre la 5<sup>o</sup> y 7<sup>o</sup> décadas de la vida, predominio en el sexo femenino, asociación con tremor, y diseminación de la distonía a otras localizaciones corporales (5).

La prevalencia en México es poco conocida y no existe un reporte confiable de estas. Las cifras a las que tenemos acceso reportan una prevalencia de entre 20 hasta 133 casos por millón dependiendo el área geográfica.(6) Los estudios actuales concuerdan que el sexo más afectado es el femenino y que la menopausia es posiblemente un factor predisponente (2, 5, 7).

En el BEB, existen espasmos sincrónicos y bilaterales de los músculos previamente mencionados, los cuales pueden ser breves o sostenidos, provocando la disminución o completo cierre de la hendidura palpebral (8). Generalmente existe una disminución del espasmo durante la realización de actividades que requieren atención o concentración, siendo un método que usan los pacientes para romper los periodos de espasmos (9). Así mismo, muchos pacientes manifiestan una apraxia de la apertura palpebral, en la cual existe



dificultad para la apertura voluntaria de los párpados por una contracción involuntaria de la porción pretarsal del músculo orbicular.

La distonía pudiera llegar a aparecer en otra parte del cuerpo. Si esto llegase a ocurrir, las presentaciones más frecuentes son la distonía oromandibular y las distonías cervicales. Frecuentemente sucede en mayores de 50 años y dentro de los primeros 5 años de la aparición de los primeros síntomas de distonía

En un 22-57% de los pacientes existen manifestaciones no motoras presentes meses previos a la aparición del blefaroespasmó, como ojo seco, fotofobia, visión borrosa o sensación de cuerpo extraño, que a su vez aumentan la frecuencia del parpadeo (10). De igual forma, algunos pacientes han presentado, meses previos, enfermedades neuropsiquiátricas como trastorno depresivo, trastorno obsesivo compulsivo o trastorno de ansiedad (11).

Por lo general, suele ser una patología de aparición esporádica, pero en un 25-27% se observa una herencia autosómica dominante con penetrancia baja en familias grandes. Recientes estudios han revelado polimorfismos de diversos genes, pudiendo ser de origen genético la aparición de las distonías focales en el adulto (12, 13). El conjunto entre polimorfismos, epigenética y factores ambientales son factores a estudiar para dilucidar aún más la etiología del blefaroespasmó (12, 14). Existen causas secundarias las cuales pueden ser lesiones en tálamo, cerebelo, cerebro medio o corteza, así como parálisis facial o miastenia gravis (15).

El diagnóstico es un reto debido a la clínica variable de la patología y todas las enfermedades neurológicas y no neurológicas que pueden simular un blefaroespasma (16). Con el paso de los años se han creado escalas clínicas para la medición de la severidad del BEB, las que están siendo usadas y validadas son la escala de discapacidad del blefaroespasma y la escala de severidad del blefaroespasma. De esta forma el diagnóstico y el manejo de los pacientes con BEB se tiende a estandarizar (17,18).

El tratamiento se basa en el uso de toxina botulínica tipo A, la cual mejora la apariencia y los espasmos con relativamente pocos y menores efectos adversos, con la desventaja de necesitar reaplicaciones (19). Así mismo, también pueden utilizarse fármacos anticolinérgicos, benzodiazepinas y baclofeno, con muchos más efectos adversos. Para distonías resistentes a tratamiento o con apraxia de la apertura palpebral, está indicada la miectomía del grupo muscular afectado. En años recientes, se han obtenido buenos resultados con la estimulación profunda cerebral de la porción interna del globo pálido. A pesar de la cantidad de tratamientos que existen en la actualidad, la calidad de vida y la satisfacción de cada paciente continúa siendo mala (17,19).

### **Gen DYT1**

Estudios genéticos previos han demostrado la existencia de variaciones en el locus de ciertos genes que confieren susceptibilidad de padecer distonía. Estas

variaciones pudieran ser las responsables de la apariencia fenotípica, edad de presentación y la propagación de las distonías a otras partes del cuerpo (20).

El gen DYT1 o TOR1A, que consiste de 5 exones localizados en el brazo largo de cromosoma 9 (9q34), codifica una proteína llamada torsina A que es parte de las AAA+ ATPasas. La torsina A se encuentra en el retículo endoplásmico y en la envoltura nuclear de la mayoría de las células especialmente las del sistema nervioso central (21). La función de esta proteína no se conoce por completo pero se cree que funciona como proteína chaperona y reguladora del metabolismo lipídico celular siempre y cuando su activación se haya logrado al unirse con Hsp70 (proteína de choque térmico) (22).

El gen DYT1 se ha estudiado ampliamente y las conclusiones han sido un tanto contradictorias. La evidencia clínica señala algunas variantes o polimorfismos del gen TOR1A que elevan el riesgo de padecer distonías focalizadas. La manera en cómo las mutaciones en este gen están implicadas en el desarrollo de BEB se conoce pobremente (23).

Un polimorfismo es una variante de la secuencia de DNA presente en la población con una frecuencia mayor al 1%. La mayoría de estos, son “silentes” (sin repercusión o cambios funcionales), pero algunos alterarán la función o regulación del mismo gen o alteraran la función de los productos de este. La forma más común de polimorfismos son los de nucleótido único (SNP's), llegando a representar hasta el 3-5% del total del ADN. Los SNP's se pueden presentar en

regiones codificantes o no codificantes del ADN, y aunque muchos no tienen efecto en la función celular, se cree que resultan predisponentes para el desarrollo de enfermedades o respuesta a medicamentos (24).

Desde el 2005, se han publicado varios artículos buscando asociación entre las distonías focales y algún polimorfismo siendo contradictorios los resultados. Entre las mutaciones encontradas del gen TOR1A se encuentran los polimorfismos: rs1801968, rs2296793, rs1182, rs3842225, rs13283584, rs11787741, rs13297609, rs2287367, rs1043186, y rs35153737 (23, 24).

Los más estudiados son el polimorfismo rs1182 y el rs1801968, los cuales brindan una mayor predisposición de desarrollar distonías focales en poblaciones como la asiática y caucásica. Sin embargo, dichos resultados no han sido completamente concluyentes y no se ha estudiado la relación directa con el blefaroespasma esencial benigno, por lo tanto, se necesitan más estudios con mayor muestra y diferente etnia para corroborar dicha asociación (23, 24, 25).

### **III - JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

#### **Justificación.**

Siendo el blefaroespasma esencial benigno (BEB) una enfermedad con alto impacto en la calidad de vida y en la economía de personas en edad productiva, se debe determinar si existe una relación entre la presencia de polimorfismos del gen DYT1 y el desarrollo de blefaroespasma esencial benigno.

Hasta nuestro conocimiento y revisión de la literatura nacional e internacional no hay estudio en población mestiza como la mexicana sobre la determinación de polimorfismos del gen DYT1 en blefaroespasmo esencial benigno.

### **Planteamiento del problema**

No existen estudios que evalúen la determinación de polimorfismos en el locus rs1182 del gen DYT1 en blefaroespasmo esencial benigno en la población mexicana.

La fisiopatología del blefaroespasmo esencial benigno es multifactorial, sin embargo, no se ha determinado una alteración genética involucrada en esta regulación.

### **IV - PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿El polimorfismo rs1182 del gen proteína 1 de distonía (DYT1) está relacionado con la presencia de blefaroespasmo esencial benigno?

### **V - OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la relación de los polimorfismos en el locus rs1182 del gen proteína 1 de distonía (DYT1) en pacientes con diagnóstico de blefaroespasmo esencial benigno.

## **V.1 - OBJETIVO SECUNDARIOS**

- Describir las características demográficas de la población con blefaroespasma esencial benigno: Sexo, edad, tiempo de evolución, predominancia de lado facial afectado.
- Determinar el polimorfismo más prevalente en población con diagnóstico de blefaroespasma esencial benigno.

## **VI - HIPÓTESIS**

El polimorfismo rs1182 del gen proteína 1 de distonía (DYT1) está relacionado con la presencia de blefaroespasma esencial benigno.

## **VII - MÉTODOS**

### **VII.1 - MÉTODO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

#### Primera Fase:

Estandarización de los procesos (acceso, explicación del estudio y aceptación del estudio por el comité de ética en investigación y el comité de investigación de la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz, IAP).

#### Segunda Fase:

##### **1. Valoración oftalmológica**

- a. Se realizará historia clínica completa de los pacientes.

- b. Se realizará exploración física oftalmológica completa de acuerdo a los estándares de la institución, incluyendo medición de agudeza visual y capacidad visual, tonometría por método de aplanación, valoración de párpados (tomando en cuenta características clínicas del BEB) y anexos oculares, superficie ocular, segmento anterior y posterior del ojo.

## **2. Toma de muestra de sangre periférica**

- a. Previo consentimiento informado (anexo 2), se tomará una muestra de sangre periférica por personal especializado de la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I. A. P. (área de enfermería o centro de investigación biomédica).
- b. Se almacenará la muestra en un tubo usando como anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

## **3. Extracción de ácido desoxirribonucléico (DNA)**

- a. Se utilizará el kit QIAamp mini kit® (Qiagen).
- b. A 200 µL de la muestra se le adicionará 250µL de solución de lisis CLS, las muestras serán incubadas a 56°C/60min, en presencia de 30 µL de proteinasa K (1mg/mL) y se agitará en vórtex cada 10min.

- c. Se adicionará 100  $\mu$ L de la solución de precipitación para incubar en refrigeración/5 min, las muestras serán centrifugadas nuevamente y se decantarán en un nuevo tubo Eppendorf para hacer los lavados con 300  $\mu$ L de isopropanol, se homogeneizará invirtiéndolos 50 veces de manera suave, con una tercera centrifugación por 5 minutos se decantará el sobrenadante y se precipitará con 300  $\mu$ L etanol al 70%.
- d. Las muestras se dejarán concentrar a 35°C/12hrs donde finalmente se agregará 100  $\mu$ L de solución de hidratación.
- e. El material genético será almacenado a -20°C hasta su estudio.

#### **4. Amplificación del gen proteína 1 de distonía (DYT1) y detección de polimorfismos en el locus rs1182**

- a. Se realizará la amplificación de la región donde se localiza el polimorfismo rs1182 en el gen DYT1 mediante técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), utilizando oligonucleótidos diseñados para la región de los SNPs (polimorfismos de nucleótido único) a estudiar.
- b. Se realizará la secuenciación directa utilizando la técnica de secuenciación por terminadores fluorescentes (BigDye) para determinar la presencia de polimorfismos.



### Tercera Fase:

- c. Se realizará una base de datos en el programa Numbers disponible para sistema operativo macOS.
- d. Se determinarán los aspectos demográficos de los pacientes, incluyendo sexo, edad, presencia de BEB, tiempo de evolución del BEB y predominio de hemicara afectada.
- e. Las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas de los pacientes serán comparadas con las frecuencias de los controles, obteniendo la relación estadística entre ellos, utilizando la prueba exacta de Fisher, con el software GraphPad Prism V.5.0. Así mismo se determinará la razón de momios para valorar la asociación entre la presencia de un polimorfismo y la presentación del blefaroespasma esencial benigno.

## **VII.2 - TIPO DE ESTUDIO**

Se trata de un estudio transversal, descriptivo y comparativo, donde se seleccionarán pacientes con diagnóstico blefaroespasma esencial benigno y sujetos sanos en la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I.A.P.

### **VII.3 - SITIO DE ESTUDIO**

Centro de investigación biomédica y el departamento de órbita, párpados y vías lagrimales en la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz, IAP, Calle Ezequiel Montes #135, Cuauhtémoc, Tabacalera, C.P. 06030, Ciudad de México, México.

### **VII.4 - PERIODO DE ESTUDIO**

El periodo de tiempo en el que se ingresarán a los pacientes al presente estudio será de Mayo de 2019 a Octubre de 2020.

### **VII.5 - POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Universo: Pacientes con diagnóstico de blefaroespasma esencial benigno (BEB) tratados en el Departamento de órbita, párpados y vías lagrimales en la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz, IAP en el periodo de Mayo de 2019 a Octubre de 2020.

Unidad de análisis: Resultados de la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen DYT1 y posterior secuenciación en el centro de investigación biomédica en la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz, IAP, en el periodo de Mayo de 2019 a Octubre de 2020.

## **VII.6 - TAMAÑO DE LA MUESTRA**

Por conveniencia para ambos grupos.

El tamaño de la muestra estará dado por los pacientes admitidos al estudio de investigación que cumplan los criterios de inclusión dentro del periodo de tiempo comprendido de mayo de 2019 a agosto de 2020. Así mismo, se recabará una cantidad de sujetos sanos de características demográficas similares para igualar a la muestra de pacientes con diagnóstico de blefaroespasma esencial benigno.

## **VII.7 - CRITERIOS DE SELECCIÓN**

### **Inclusión**

1. Pacientes masculinos o femeninos con blefaroespasma esencial atendidos en el Departamento de órbita, párpados y vías lagrimales en la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz, I.A.P., en el periodo de Mayo de 2019 a Octubre de 2020.
2. Pacientes masculinos o femeninos sanos atendidos en la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz, I.A.P., en el periodo de Mayo de 2019 a Octubre de 2020.
3. Pacientes mayores de 18 años de edad.
4. Pacientes que autoricen su participación y firmen el consentimiento informado.

### **No inclusión**

1. Pacientes tratados en otros hospitales ajenos a la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz, I.A.P.
2. Pacientes con otro tipo de diagnóstico oftalmológico agregado o cirugía oftalmológica previa.
3. Pacientes con blefaroespasma secundario.
4. Diagnóstico de distonía heredo-degenerativa.
5. Pacientes de los que no se puedan obtener las variables de estudio.

### **Eliminación**

1. Pacientes que deseen retirar su consentimiento para continuar en el estudio.
2. Muestras con problemas en su procesamiento.

## **VII.7.1 - TÉCNICA DE MUESTREO**

No probabilístico de casos consecutivos.

## **VII.8 - RECURSOS**

### **VII.8.1 - RECURSOS HUMANOS**

**Tutor / Investigador responsable:**

Dr. Gerardo Graue Moreno

**Investigadores Asociados/Colaboradores:**

Dr. Héctor Javier Pérez Cano

**Residente de 3º año de oftalmología:**

Dr. Mario Vera González

**VII.8.2 - RECURSOS MATERIALES**

La Fundación Hospital Nuestra Señora de La Luz, a través de su Centro de Investigación Biomédica, cuenta con la infraestructura y los recursos materiales necesarios para almacenar y procesar las muestras recabadas.

Los recursos materiales adicionales requeridos son:

- Hoja de recolección de datos.
- Consentimiento informado.
- Kit QIAamp mini kit® (Qiagen).

**VII.9 - FACTIBILIDAD**

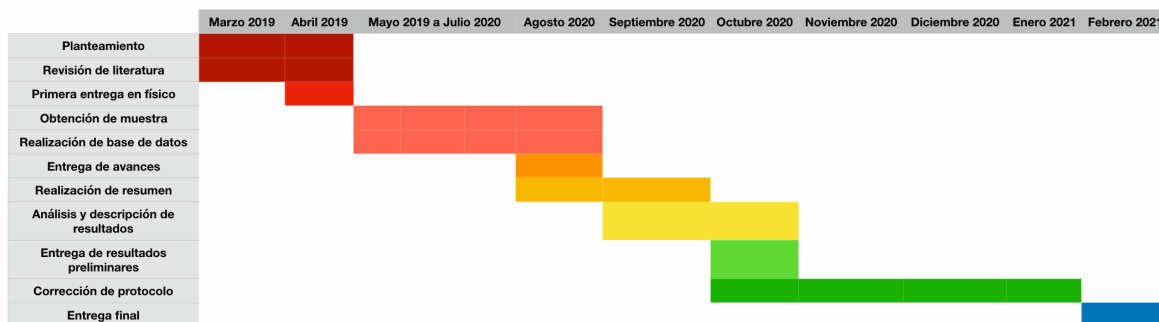
La Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz es uno de los principales centros de atención de enfermedades oculares del país, el departamento de órbita, párpados y vías lagrimales cuenta con equipos modernos y recursos humanos

preparados. Por otro lado, la realización del estudio no genera un gasto económico de gran impacto para la institución ni para los pacientes. Esto hace que el protocolo que se plantea tenga un alta grado de factibilidad

## VII. 10 - BIOSEGURIDAD

El presente estudio no representa ningún riesgo a la salud o integridad de los pacientes ni al equipo médico del hospital. Se trabajará de acuerdo a las normas oficiales relacionadas con el tema de bioseguridad, NOM 007 y NOM 087 principalmente.

## VII.11 - CRONOGRAMA GENERAL DE ACTIVIDADES



## VII.12 - CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente protocolo de investigación se realizará con base en el reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, que se

encuentra en vigencia actualmente en el territorio de los Estados Unidos Mexicanos.

Título segundo: De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos, capítulo 1, Disposiciones generales. En los artículos 13 al 27.

Título sexto: De la Ejecución de la Investigación en las Instituciones de Atención a la Salud. Capítulo único, contenido en los artículos 113 al 120.

Así como también acorde con los códigos internacionales de ética:

Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial. Helsinki, Finlandia, Junio 1964. Y enmendada por la 29ª Asamblea Médica Mundial de Tokio, Japón, Octubre de 1975, y la Asamblea General de Seúl, Corea, en 2008.

Así mismo, cumple con los principios recomendados por la Declaración de Helsinki, las buenas prácticas clínicas y la normatividad institucional en materia de investigación; de esta misma forma se cubren los principios de: Beneficencia, No Maleficencia, Justicia y Equidad, tanto para el personal de salud, como para los pacientes.

Acorde con las pautas éticas internacionales emitidas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la OMS, el estudio tiene riesgo mínimo, ya que es observacional sin modificación de la historia natural de la enfermedad y no tiene riesgos agregados a los inherentes a las evaluaciones de rutina. Lo anterior se ratificará con la

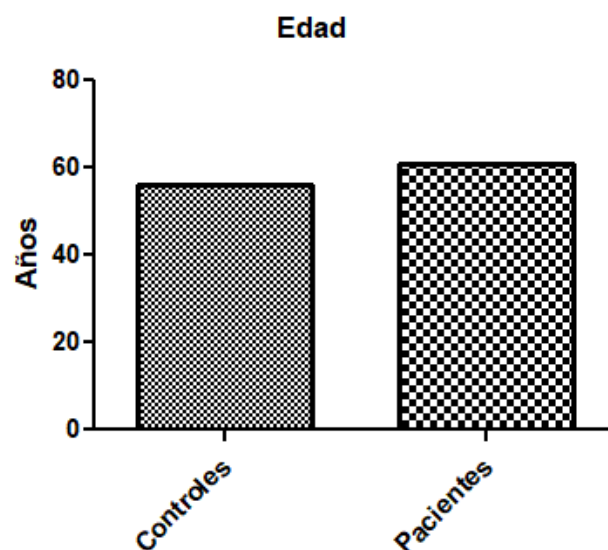
adecuada obtención del consentimiento informado acorde a la edad y condición de cada paciente.

Este protocolo se presentará ante el comité local de investigación de la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz, IAP para su evaluación y aprobación.

## VIII. RESULTADOS

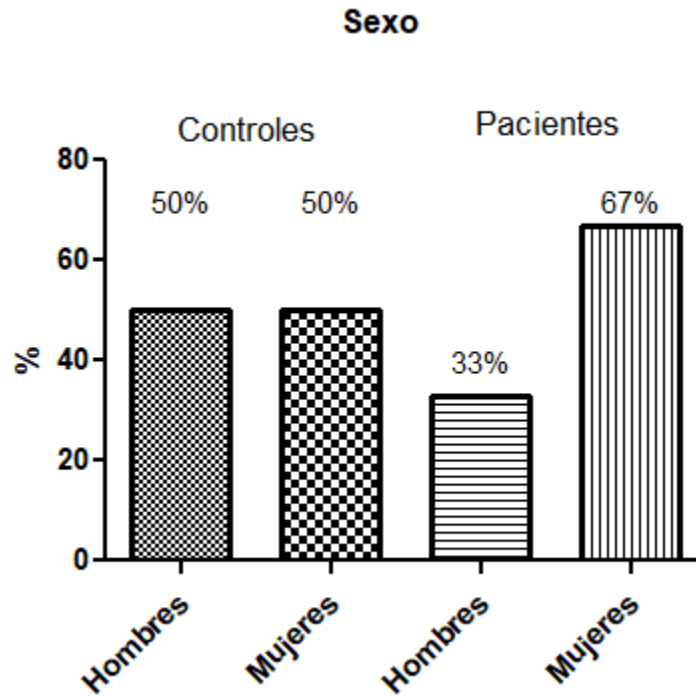
Se admitieron 6 pacientes al grupo de casos con diagnóstico de blefaroespasma esencial benigno y 6 pacientes al grupo de controles. Los pacientes admitidos al grupo control se encontraban en un rango de edad de 50 a 61 años, con una media de edad de 56, siendo el 50% hombres y el 50% mujeres, mientras que el grupo de casos se encontraba en un rango de edad de 59 a 69 años, con una media de edad de 61, siendo el 33% hombres y el 67% mujeres. (Gráfica 1 y 2).

Al realizar la extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico), no se logró obtener el mismo de dos muestras de pacientes del grupo de casos, por lo que fueron excluidos.



GRÁFICA 1. MEDIA DE EDAD

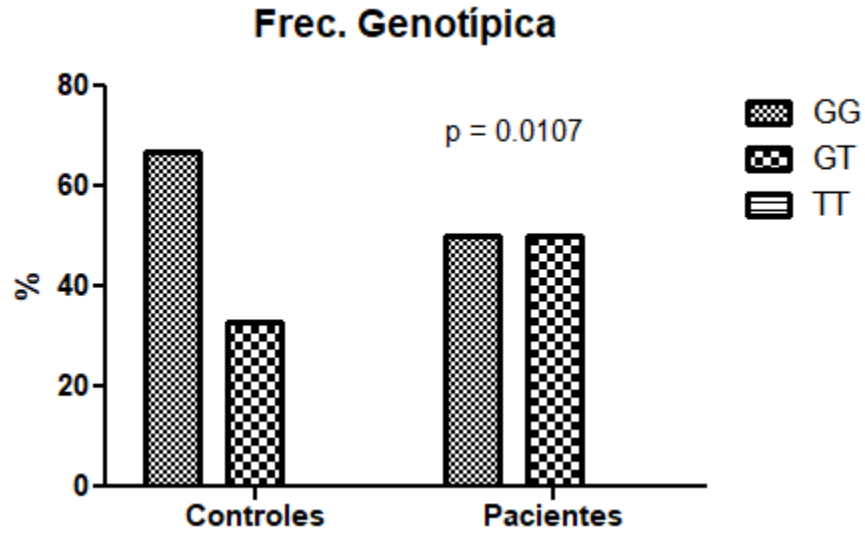




**GRÁFICA 2. DISTRIBUCIÓN POR SEXO**

En el análisis de la secuenciación se encontró una frecuencia para el genotipo GG en el grupo de controles de 67% y de 33% para el genotipo GT. En el grupo de casos, se encontró una frecuencia genotípica del 50% para GG y 50% para GT. En ninguna muestra se encontró la presencia del genotipo TT.

Se realizó el análisis de la frecuencia genotípica usando prueba exacta de Fisher, obteniendo valores estadísticamente significativos con un valor de  $p=0.0107$  (Gráfica 3) y una razón de momios de 2.0 (Tabla 1).



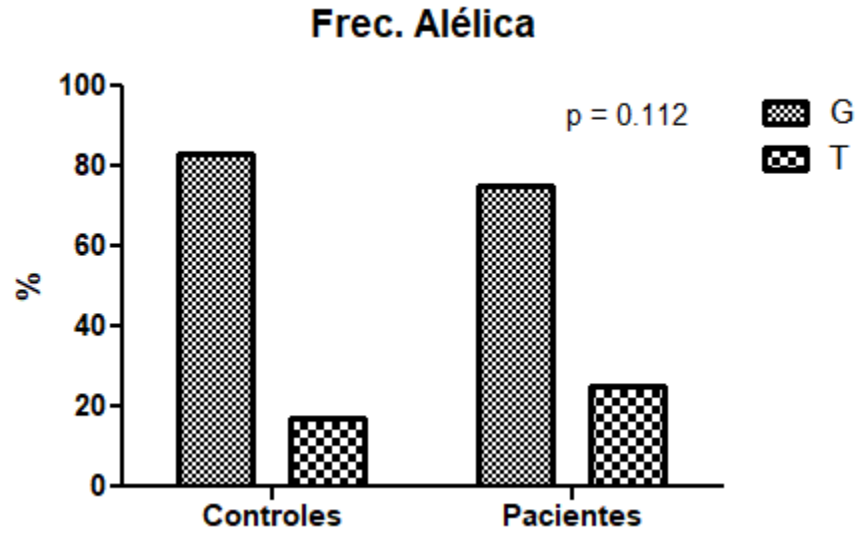
**GRÁFICA 3.** FRECUENCIA GENOTÍPICA

	Controles	Pacientes	p	OR
GG	4	2	-	-
GT	2	2	0.0107	2.0
TT	0	0	-	-

**TABLA 1.** FRECUENCIA GENOTÍPICA (\*prueba exacta de Fisher)

Se realizó un análisis de la frecuencia alélica, encontrando una frecuencia del 83% para el alelo G y del 17% para el alelo T en el grupo de controles y de 75% para el alelo G y de 25% para el alelo T en el grupo de casos.

En el análisis de la frecuencia alélica usando prueba exacta de Fisher, no se obtuvo un valor estadísticamente significativo ( $p=0.112$ ,  $OR=1.63$ ) (Gráfica 4, Tabla 2).



**GRÁFICA 4.** FRECUENCIA ALÉLICA

	Controles	Pacientes	p	OR
G	10	6	-	-
T	2	2	0.112	1.63

**TABLA 2.** FRECUENCIA ALÉLICA (\*prueba exacta de Fisher)

## IX. DISCUSIÓN

En la población estudiada, los pacientes con presencia de blefaroespasma esencial se encontraban dentro del rango de edad de 59 a 69 años, con una media de edad de 61. Así mismo se observó un predominio del sexo femenino en el grupo de casos con una razón 2:1, tal como se había descrito en estudios previos (2).

El 100% de los pacientes manifestaron predilección de afección por una hemicara, siendo predominante la afección al lado derecho (75%). El 100% de los pacientes afirmó no haber recibido tratamiento desde el inicio de los síntomas hasta el día del mismo.

El blefaroespasma es una distonía facial poco frecuente en nuestra población la cual se caracteriza por contracciones involuntarias en la región periorcular y que pueden llegar a causar un deterioro en la calidad de vida de las personas afectadas. La etiología de dicho padecimiento aún no se encuentra bien identificada. Sin embargo, estudios recientes han sugerido un origen genético determinado por alteraciones en el gen DYT o TOR1, como lo han sugerido G. Charlesworth et al y G. Chen et al. (18, 19, 29).

Se ha reportado en literatura que la presencia de polimorfismos en el gen DYT1 están fuertemente asociada a la presentación clínica de la enfermedad, el más estudiado ha sido el rs1182. G. Defazio et al. reportaron que la presencia del alelo T, en los genotipos heterocigotos GT y homocigotos TT, se relacionaba con una

mayor predisposición de presentar una distonía en comparación con los pacientes que presentan la forma homocigota del alelo G (8).

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestra investigación, podemos observar que la presencia de un genotipo TT no es frecuente en nuestra población y sólo se logra encontrar la presencia del alelo T en el genotipo GT de rs1182. Sin embargo, no pudimos ligar la presencia de dicho alelo a la presencia de la enfermedad, presentándose de manera similar tanto en individuos admitidos tanto al grupo de controles como al de casos. Se pudo concluir que la presencia de un genotipo GG puede llegar a tener un factor protector para la enfermedad ya que se encontró en un mayor número de individuos sanos, sin embargo, la presencia del mismo no exime la posibilidad de presentarla.

El estudio realizado presenta algunas limitaciones. Al ser el blefaroespasma esencial benigno una enfermedad poco frecuente en nuestra población, y al haberse realizado nuestro estudio durante la crisis sanitaria causada por el virus SARS-CoV2, se limitó el flujo de pacientes a nuestra institución, por lo que el número de muestra fue reducido y se recomienda aumentar la muestra para poder obtener una asociación más fuerte en los resultados expuestos.

## **X. CONCLUSIONES**

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede observar que la presencia de un genotipo GG se comporta como un factor protector ante el desarrollo de la enfermedad, podemos sugerir que el genotipo GT es un factor de riesgo para desarrollar blefaroespasmos, aún cuando, al analizar la frecuencia alélica, la presencia del alelo T como determinante de la enfermedad no resultó ser estadísticamente significativo, esto debido a las limitaciones del estudio. Es necesario ampliar el tamaño de la muestra para tener una conclusión con mayor poder estadístico.

## XI - REFERENCIAS

1. Albanese A, Di Giovanni M, Lalli S. Dystonia: diagnosis and management. *European Journal of Neurology*. 2018;26(1):5-17.
2. Steeves TD, Day L, Dykeman J, Jette N, Pringsheim T. The prevalence of primary dystonia: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 2012;27:1789-1796.
3. Valls-Sole J, Defazio G. Blepharospasm: Update on Epidemiology, Clinical Aspects, and Pathophysiology. *Frontiers in Neurology*. 2016;7.
4. Hallett M, Evinger C, Jankovic J, Stacy M. Update on blepharospasm: Report from the BEBRF International Workshop. *Neurology*. 2008;71(16):1275-1282.
5. Lindeboom R, De Haan R, Aramideh M, Speelman J. The blepharospasm disability scale: An instrument for the assessment of functional health in blepharospasm. *Movement Disorders*. 1995;10(4):444-449.
6. Defazio G, Livrea P. Epidemiology of primary blepharospasm. *Movement Disorders*. 2001;17(1):7-12.
7. Defazio G, Hallett M, Jinnah H, Conte A, Berardelli A. Blepharospasm 40 years later. *Movement Disorders*. 2017;32(4):498-509.
8. Hwang C, Eftekhari K. Benign Essential Blepharospasm. *International Ophthalmology Clinics*. 2018;58(1):11-24.
9. Evinger C. Animal Models for Investigating Benign Essential Blepharospasm. *Current Neuropharmacology*. 2013;11(1):53-58.
10. Jahanshahi M, Torkamani M. The cognitive features of idiopathic and DYT1 dystonia. *Movement Disorders*. 2017;32(10):1348-1355.
11. Viewpoints on the Clinical Heterogeneity of Blepharospasm. *Current Advances in Neurology and Neurological Disorders*. 2017:1-4.
12. Moore G, Anderson R. The Benign Essential Blepharospasm Research Foundation. *International Ophthalmology Clinics*. 2018;58(1):25-31.
13. Alemán G, de Erausquin G, Micheli F. Cognitive disturbances in primary blepharospasm. *Movement Disorders*. 2009;24(14):2112-2120.
14. Vijayakumar D, Jankovic J. Medical treatment of blepharospasm. *Expert Review of Ophthalmology*. 2018;13(4):233-243.
15. Weiss D, Hieber L, Sturm J, Börtlein A, Buchthal J, Dippon C et al. Health-related quality of life outcomes from botulinumtoxin treatment in blepharospasm. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2018;172:130-133.

16. Defazio G, Matarin M, Peckham E, Martino D, Valente E, Singleton A et al. The TOR1A polymorphism rs1182 and the risk of spread in primary blepharospasm. *Movement Disorders*. 2009;24(4):613-616.
17. Siokas V, Aloizou AM, Tsouris Z, Michalopoulou A, Mentis AFA, Dardiotis E. Risk factor genes in patients with dystonia: a comprehensive review. *Tremor Other Hyperkinet Mov*. 2018; 8. doi: 10.7916/D8H438GS
18. Charlesworth G, Bhatia K, Wood N. The genetics of dystonia: new twists in an old tale. *Brain*. 2013;136(7):2017-2037.
19. Chen Y, Chen K, Burgunder J, Song W, Huang R, Zhao B et al. Association of rs1182 polymorphism of the DYT1 gene with primary dystonia in Chinese population. *Journal of the Neurological Sciences*. 2012;323(1-2):228-231.
20. Groen J, Ritz K, Tanck M, van de Warrenburg B, van Hilten J, Aramideh M et al. Is TOR1A a risk factor in adult-onset primary torsion dystonia?. *Movement Disorders*. 2013;28(6):827-831.
21. Ozelius L, Page C, Klein C, Hewett J, Mineta M, Leung J et al. The TOR1A (DYT1) Gene Family and Its Role in Early Onset Torsion Dystonia. *Genomics*. 1999;62(3):377-384.
22. Kamm C, Asmus F, Mueller J, Mayer P, Sharma M, Muller U et al. Strong genetic evidence for association of TOR1A/TOR1B with idiopathic dystonia. *Neurology*. 2006;67(10):1857-1859.
23. Ginevrino M, Valente E. The multiple faces of TOR1A: different inheritance, different phenotype. *Brain*. 2017;140(11):2764-2767.
24. Franco R, Sharma N. Genetic Association of the TOR1A Locus with Focal Dystonia. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*. 2010;143(2\_suppl):P82-P82.
25. Sharma N, Franco R, Kuster J, Mitchell A, Fuchs T, Saunders-Pullman R et al. Genetic evidence for an association of the TOR1A locus with segmental/focal dystonia. *Movement Disorders*. 2010;25(13):2183-2187.





## Anexo 2. Consentimiento Informado



### CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN PARA PARTICIPAR EN PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

En esta institución se desarrollan investigaciones que forman parte de nuestro quehacer científico. Las características de su padecimiento son consideradas de interés para participar en este estudio de acuerdo a las especificaciones siguientes:

#### Datos generales

<i>Datos del paciente</i>	Nombre: Fecha de nacimiento:
<i>Expediente clínico No.</i>	
<i>Médico informante (investigador principal):</i>	Dr. Mario Vera González Firma:
<i>Diagnóstico</i>	Blefaroespasma esencial benigno

#### Datos de la investigación

<i>Nombre del protocolo</i>	Polimorfismo rs1182 del gen DYT1 en blefaroespasma esencial benigno
<i>Investigadores</i>	Dr. Mario Vera González. Dr. Gerardo Graue Moreno. Dr. Hector Pérez Cano.
<i>Justificación y objetivos</i>	Determinar la relación entre la presencia del polimorfismo rs1182 del gen DYT1 y el desarrollo de blefaroespasma esencial benigno.
<i>Periodo de estudio o duración</i>	Mayo de 2019 a Octubre de 2020.
<i>Cantidad de sujetos que participarán</i>	
<i>Descripción de los métodos a emplear y su propósito</i>	Toma de muestra de sangre periférica completa, usando EDTA como anticoagulante. Se realizará extracción de DNA utilizando el kit QIAamp mini kit® (Qiagen) siguiendo las indicaciones del proveedor, se realizará la amplificación del gen ARK1B1 mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en ingles) utilizando oligonucleótidos diseñados para la región de los SNPs a estudiar. Posteriormente se realizará secuenciación directa utilizando la técnica de secuenciación por terminadores fluorescentes (BigDye). Se analizarán los datos obtenidos.
<i>Beneficios esperados:</i>	
<i>Alternativas:</i>	No participar en el estudio.
<i>Riesgos o molestias:</i>	Dolor en sitio de punción, equimosis, infección.
<i>Grupo de control</i>	En caso de que la presente investigación incluya un grupo de control, la selección de los participantes se sujetará a un proceso estrictamente aleatorio e imparcial, privilegiando la prevención de cualquier riesgo o daño para sus integrantes.

## CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN PARA PARTICIPAR EN PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

<i>Gastos</i>	Los gastos propios de la investigación serán cubiertos por la institución.
<i>Confidencialidad</i>	Su identidad y la información que proporcione como parte de esta investigación serán tratadas bajo criterios de confidencialidad. En caso de que los resultados exijan su identificación, previamente se le solicitará la autorización correspondiente.
<i>Dudas, aclaraciones y actualización</i>	<p>El participante tendrá derecho a recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y su tratamiento.</p> <p>Asimismo, durante el presente estudio le proporcionaremos información actualizada sobre su estado de salud para que esté en posibilidad de decidir si continúa participando.</p> <p>Es importante que sepa que retirar su participación no afectará su atención en el hospital.</p>

### Consentimiento

Por este medio manifiesto mi satisfacción con la información recibida y, consciente de las especificaciones y en qué consiste la investigación descrita en este documento, sus beneficios, riesgos y consecuencias, **otorgo mi consentimiento para incorporarme a ella, asumiendo el compromiso de (1) asistir puntualmente a las citas que se me indiquen y (2) proporcionar verazmente la información de mi evolución en la forma y periodicidad que se requiera.**

Asimismo, entiendo que puedo retirarme de esta investigación voluntariamente en cualquier momento sin mayor requisito que la manifestación al investigador principal o a la Dirección Médica de este hospital.

Ciudad de México a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Firma del paciente

### Testigos

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma

Domicilio:

Domicilio:

Relación con el paciente:

Relación con el paciente: