



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD LEÓN**

**ANÁLISIS GENÉTICO RELACIONADO A
FENOTIPOS DE TUBULINOPATÍAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS**

P R E S E N T A:

Sofía Rodríguez Amézquita

TUTORES EXTERNOS:

**Dr. Víctor Hugo
Hernández González
Dra. Valeria Piazza**

TUTOR INTERNO:

Dra. Kalpana Nanjareddy





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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD LEÓN**

**ANÁLISIS GENÉTICO RELACIONADO A
FENOTIPOS DE TUBULINOPATÍAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS**

P R E S E N T A:

Sofía Rodríguez Amézquita

TUTORES EXTERNOS:

**Dr. Víctor Hugo
Hernández González
Dra. Valeria Piazza**

TUTOR INTERNO:

Dra. Kalpana Nanjareddy



Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas de mi vida que han resaltado alguna cualidad en mi, pues me han llenado de confianza en momentos difíciles para salir adelante y decidir. Gracias por su empatía y ayuda.

Quiero agradecer a mis tutores, la Dra. Valeria Piazza y el Dr. Victor Hugo Hernández por darme la oportunidad y la confianza de trabajar en su laboratorio, por brindarme su atención incondicional y fomentar el trabajo en equipo. También agradezco a mis compañeros del laboratorio de biofotónica por las convivencias y apoyos. A los cafés del CIO que fueron reconfortantes en la época de frío y esenciales para aclarar la mente.

Estoy infinitamente agradecida con mis maestros de licenciatura pues fueron los encargados de formarme como profesionista. Sobre todo a la Dra. Harumi Shimada por resaltar mis cualidades entusiastas, tener la sensibilidad de escuchar y su facilidad de explicar; al Dr. Antonio Hernández por inducir la curiosidad y fomentar la discusión de libre opinión con base científica; al Dr. Julio Amezcua por resolver mis dudas de laboratorio y ser un excelente maestro; a la Dra. Alejandra Rougon y la Dra. Kalpana Nanjareddy por ser excelentes investigadoras y ser ejemplo de mujeres en la ciencia. También, al Dr. Julio Vega, al Dr. Aarón Vélez y demás profesores por compartir su conocimiento. A la UNAM por brindarme la oportunidad de estudiar, a las becas SUBES por brindar apoyo a lo largo de mi carrera y a todo el personal de la ENES-León que están al servicio de los alumnos y facilitan los trámites de papeleo.

Finalmente estoy agradecida con Dios por darme inteligencia, salud, muchos dones y la capacidad de soñar. Agradecida también, por la familia que me dio. Por darme una abuelita tan amorosa que fue pieza fundamental para revolucionar el rol de la mujer en mi familia, gracias a ella mi mamá y mis tías son lo que son ahora y por ende yo. En especial quiero agradecer a mi mamá por ser mi fan número uno, también a mi papá, mi hermana, mis tías y tíos que me aman y me han apoyado de forma incondicional para hacer realidad lo que deseo. A mis amigos que alimentan mi vida con amor, risas y bonitas experiencias.

Índice

Resumen.....	5
Introducción	6
La mielina	6
Capítulo I: “Diagnóstico genético en fenotipo H-ABC”	14
Antecedentes	14
Leucoencefalopatías	14
Hipomielinización con atrofia en los ganglios basales y cerebelo.....	14
Diagnósticos genéticos en pacientes diagnosticados clínicamente con H- ABC.....	15
Justificación	17
Hipótesis.....	18
Objetivos	18
Objetivo general.....	18
Objetivo particular	18
Materiales y métodos.....	19
Métodos para la identificación y análisis de trastornos de migración neuronal.....	19
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	21
Preparación del gel de agarosa y visualización de las moléculas	30
Secuenciación	30
Secuenciación Sanger	31
Interpretación de un electroferograma.....	33
Recolección de muestra	34
Extracción de ADN.....	34
Cuantificación de la muestra.....	34
Método para el diseño de <i>primers</i> específicos	34
Evaluación de los <i>primers</i> específicos.....	35
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	37
Alícuotas de ADN	37
Dilución de <i>primers</i>	38
Métodos para la optimización de la amplificación por PCR	39

Optimización de la PCR con amplificación de alta fidelidad	40
Optimización de amplificación a diferentes temperaturas de apareamiento	41
Optimización de amplificación por agentes desnaturalizantes (DMSO y BSA)	42
Gel de agarosa.....	44
Adquisición de bandas amplificadas del gel de agarosa y purificación de los fragmentos amplificados.....	45
Cuantificación de ADN.....	46
Finch TV	46
Resultados.....	46
<i>Primers</i> específicos diseñados para el gen TUBB4A	46
Evaluar la especificidad de los <i>primers</i> a través del análisis PCR semicuantitativo para cada amplicón.....	48
Amplificación por PCR y secuenciación del amplicón 1	48
Discusión.....	62
Mutación típica p.Asp249Asn en TUBB4A.....	62
Correlación genotipo-fenotipo	64
Conclusión	66
Capítulo II: “Estrategia molecular para diagnóstico genético en pacientes con fenotipos asociados a tubulinopatías”	68
Antecedentes	68
Tubulinopatías	68
Justificación	69
Hipótesis.....	70
Objetivos	70
Objetivo general.....	70
Objetivo particular	70
Materiales y métodos.....	70
PCR Multiplex.....	70
PCR con <i>primer</i> degenerado (DOP-PCR)	71
Datos de tubulinas.....	71
Método para el diseño de <i>primers</i> específicos	71
Método para el diseño de <i>primer</i> degenerado.....	72
Resultados.....	72

Diseño de <i>primers</i> específicos Gamma tubulina.....	72
TUBB (beta tubulina clase I)	80
TUBA1A.....	81
Implementación de la PCR Multiplex.....	87
Discusión.....	90
Conclusión	90
Referencias.....	91
Anexo1.....	97

Resumen

Las tubulinopatías o disgenesia cortical relacionada con la tubulina son enfermedades genéticas de reciente descripción causadas por mutaciones en los genes de la tubulina (TUBA1A, TUBB2A, TUBB2B, TUBB3, TUBB4A, TUBB, TUBG1, TUBA8). Las primeras tubulinopatías se describieron en pacientes con lisencefalia y polimicrogiria en los genes TUBA1A y TUBB2B. Actualmente, las malformaciones cerebrales que generan las tubulinopatías incluyen: variedad de lisencefalías, displasia cortical, microlisencefalia, entre otras. Estos fenotipos no son exclusivos de un gen mutado de tubulina, sino que se puede presentar el mismo fenotipo en diferentes genes mutados de tubulina. A excepción de las mutaciones en el gen TUBB4A, generan dos fenotipos particulares: disfonía susurrante (DYT4) e hipomielinización con atrofia en ganglios basales y cerebelo (H-ABC). Las mutaciones en TUBB4A son adquiridas o heredadas y se presentan tanto en la etapa infantil como en la adultez, siendo la primera más frecuente. En el año 2017, en México se reportó el primer caso de un paciente diagnosticado clínicamente a lo que parece ser una tubulinopatía (Kleinert-Altamirano *et al.*, 2016). El objetivo de este estudio es encontrar la mutación subyacente en el paciente a través de un diagnóstico genético. El diagnóstico genético del paciente se llevo a cabo con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de Sanger bidireccional en el gen TUBB4A. Además, se propuso una estrategia con PCR Multiplex para el diagnóstico genético de futuros casos con tubulinopatías distinguibles para los demás genes de tubulina. Los resultados obtenidos en el diagnóstico con PCR semicuantitativo mostraron la mutación 745 G>A (p. Asp249Asn) en el gen TUBB4A. Esta mutación previamente reportada es considerada como la mutación clásica para el fenotipo: "Hipomielinización con atrofia en ganglios basales y cerebelo (H-ABC)" (Hamilton *et al.*). Sin embargo, existen pacientes diagnosticados con la mutación clásica pero solo presentan la hipomielinización, así mismo, hay pacientes con mutaciones distintas a la clásica en el gen TUBB4A que presentan el fenotipo H-ABC, pero más agresivo. Esto demuestra la amplia plasticidad fenotípica en el gen TUBB4A. El paciente diagnosticado presenta la mutación clásica para la tubulinopatía H-ABC. Este estudio pretende ampliar el panorama de estas enfermedades para la comprensión de futuros casos clínicos.

Introducción

La mielina

La mielina es una membrana lipídica del sistema nervioso vertebrado, que funciona como aislante eléctrico aumentando la velocidad de los estímulos que se transmiten entre el cuerpo de una célula nerviosa y su objetivo. Las membranas de mielina se originan y forman parte de las células de Schwann en el sistema nervioso periférico y las células oligodendrogliales en el sistema nervioso central. La vaina de mielina se enrolla a lo largo de todo el axón en forma espiral, generando segmentos cubiertos llamados internodos y espacios sin mielina conocidos como nodos (Nave and Werner, 2014, Raine, 1977)

En el sistema nervioso central, las células gliales comprenden los astrocitos, oligodendrocitos y microglia. Los oligodendrocitos derivan de las células progenitoras de oligodendrocitos (OPC), que tienen la capacidad de proliferar, migrar y diferenciarse en oligodendrocitos mielinizantes. La desmielinización es el proceso o estado resultante de la pérdida o destrucción de la mielina (Figura 1) (Domingues *et al.*, 2016, Joshi and Cleveland, 1989)

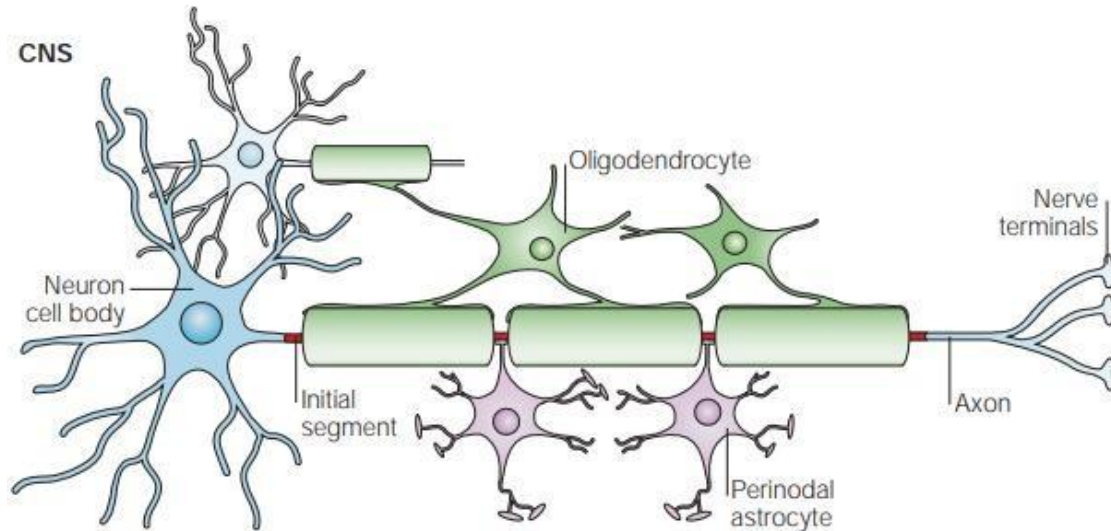


Figura 1. Estructura de axones mielinizados. Los oligodendrocitos son células gliales que forman la vaina de mielina envolviendo su membrana varias veces alrededor del axón (Poliak and Peles, 2003).

Microtúbulos

Los microtúbulos (Mts) son estructuras dinámicas y son el componente principal del

citoesqueleto que participan en diversas funciones celulares como la separación de cromosomas durante la mitosis, el transporte intracelular, la polaridad celular y la motilidad en cilios y flagelos, entre otros (Cooper and Hausman, 2000, Stringham *et al.*, 2012). Los MTs también son esenciales durante la neurogénesis, la migración neuronal, y cuando las neuronas alcanzan su posición final, ayudan a estabilizar los procesos axonales para mediar la comunicación celular en la sinaptogénesis (Collombat *et al.*, 2003).

Los Mts están formados por la proteína globular tubulina. Las subfamilias α -tubulina y β -tubulina se unen para formar heterodímeros que componen los MTs (Cooper and Hausman, 2000, Risinger *et al.*, 2009). La subfamilia de γ -tubulinas se unen a los heterodímeros de α -tubulina y β -tubulina para llevar a cabo la nucleación y ensamblaje de microtúbulos (Dutcher, 2003). Los dímeros de α y β -tubulina se ensamblan polarmente para formar protofilamentos lineales, a su vez estos protofilamentos se unen para formar la estructura de cilindro hueco que da forma al microtúbulo. La subunidad α -tubulina tiene el extremo negativo y se une con el extremo positivo de las subunidades β -tubulina (Figura 2) (Nogales and Wang, 2006). En consecuencia, los microtúbulos son estructuras polares y esta polaridad es una consideración importante para determinar la dirección de su movimiento y realizar funciones como: la separación cromosómica durante la mitosis, el transporte intracelular en neuronas etc. (Cooper and Hausman, 2000). La γ -tubulina forma los complejos tetrameros (γ -TuSC) y el complejo anillo (γ -TuRC) que moldean y catalizan el ensamblaje de los protofilamentos de microtúbulos. El complejo tetramérico y el complejo anillo, ambos sirven para la nucleación de microtúbulos. (Figura 3) (Wade, 2009, Wakefield *et al.*, 2018).

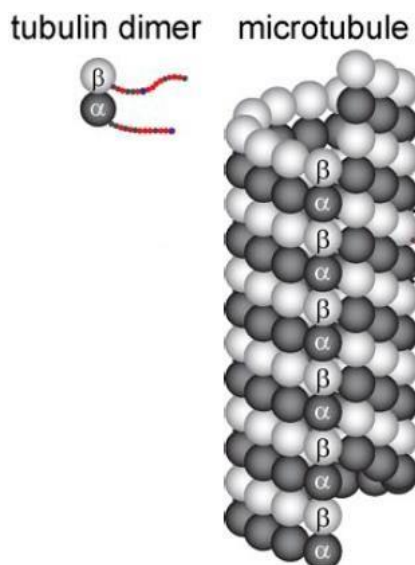


Figura 2. Estructura del microtúbulo. El microtúbulo está formado por dimeros de α -tubulina,

representado con esfera negra y β -tubulina, representado con esfera blanca. Estos dímeros forman protofilamentos lineales. La unión de 13 protofilamentos forma la apariencia de cilindro hueco del microtúbulo (Janke, 2014).

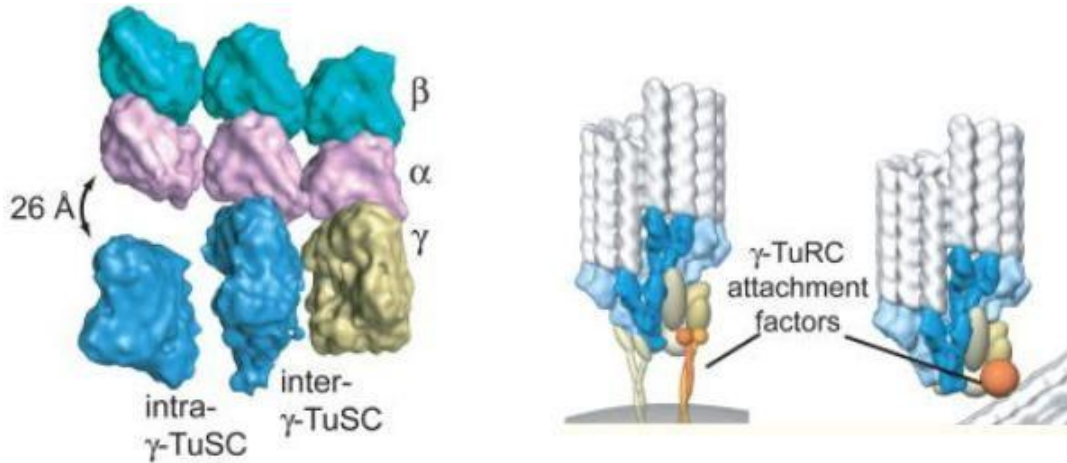


Figura 3. Estructura del complejo tetramérico (γ -TuSC) y complejo anillo (γ -TuRC) formados por γ -tubulina. La proteína γ -tubulina interactúa con los dímeros de α - y β -tubulina promoviendo la nucleación de los microtúbulos y formando el complejo (γ -TuSC). Este complejo se ensambla con otras proteínas en complejo de anillo (γ -TuRC) creando un casquete que sirve como plantilla para organizar los protofilamentos y generar microtúbulos simétricos (Kollman *et al.*, 2010).

Inestabilidad dinámica de los microtúbulos

La inestabilidad dinámica de los microtúbulos se refiere a la variación entre el ciclo de crecimiento y el ciclo de despolimerización en los microtúbulos. Este proceso depende de la hidrólisis de guanosín trifosfato (GTP) a guanosín difosfato (GDP). Los heterodímeros de tubulina orientan los extremos del microtúbulo con carga negativa y positiva. La α -tubulina tiene un motivo que se une específicamente a GDP formando el extremo negativo y la β -tubulina tiene un motivo que se une a GTP formando una tapa con extremo positivo, el cual promueve el crecimiento del microtúbulo adhiriéndose nuevos heterodímeros. Cuando la enzima GTPasa hidroliza el GTP a GDP en el extremo de β -tubulina se cambia la carga positiva a negativa promoviendo la despolimerización de los microtúbulos. Ambos procesos ocurren simultáneamente y la velocidad va a favorecer uno de los 2 ciclos, es decir, si las nuevas moléculas de tubulina unidas a GTP se agregan más rápidamente de lo que se hidroliza GTP, el microtúbulo continúa el crecimiento. Pero si la velocidad de la hidrólisis de GTP a GDP es más rápida se conduce al desmontaje y contracción del microtúbulo (Figura 4) (Cooper and Hausman, 2000). Las proteínas asociadas a microtúbulos o MAP son

proteínas que interactúan con los microtúbulos. Las MAP pueden modificar el comportamiento de los MTs dentro de la célula, regulan el proceso de polimerización y estabilizan los microtúbulos en ubicaciones particulares. Estos procesos determinan a su vez la polaridad de la célula (Romaniello *et al.*, 2018).

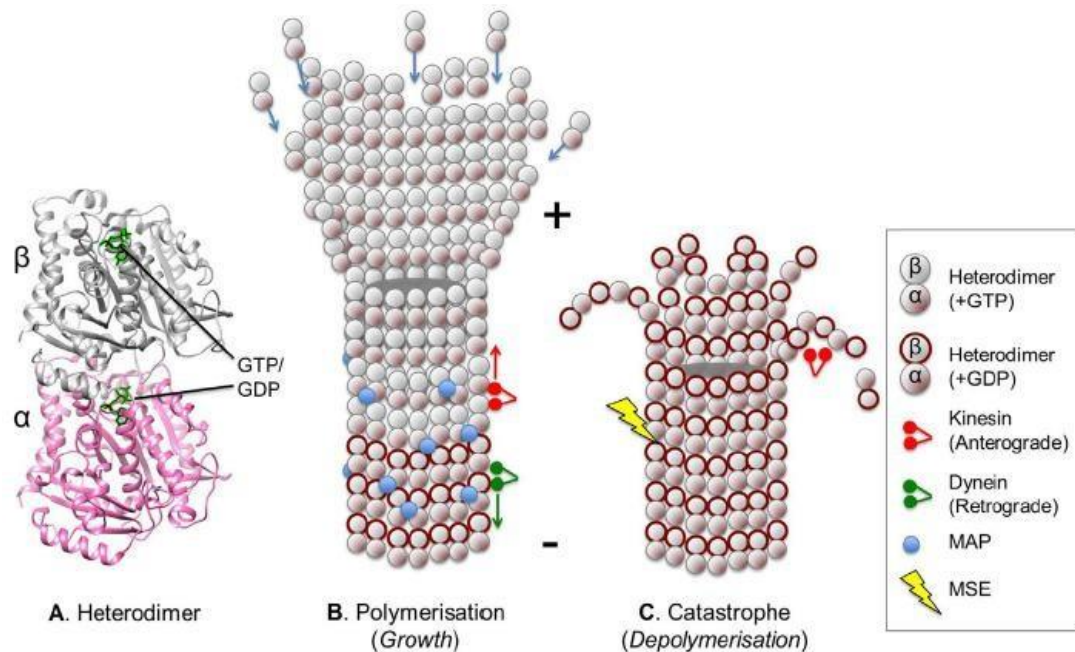


Figura 4. Inestabilidad dinámica de los microtúbulos se refiere a la polimerización y despolimerización de los microtúbulos. A) Estructura del heterodímero de tubulina: la α -tubulina tiene un motivo que se une específicamente a guanidin trifosfato (GTP) generando un extremo del microtúbulo con carga negativa (-) y en el otro extremo del microtúbulo, la β -tubulina tiene un motivo que se une tanto a guanidin trifosfato (GTP) como a guanidin difosfato (GDP), variando la carga de positiva a negativa y viceversa. B) Polimerización del microtúbulo: los heterodímeros de tubulina se polimerizan formando filamentos ordenados en forma de cilindro hueco, la polimerización es dirigida por la carga positiva en el extremo de β -tubulina unido a GTP. Existen proteínas asociadas a microtúbulos (MAP), las cuales regulan la polimerización y transportan cargas. Las proteínas motoras como: la quinesina y dineína son los “vehículos” transportadores de cargas intracelulares a través de los filamentos de tubulina. El transporte retrogrado es mediado por las dineínas que en el caso de las neuronas reciben los impulsos eléctricos de la sinapsis, el transporte anterograde es mediado por las cinesinas que transportan cargas para enviar los impulsos eléctricos a otra neurona. C) Despolimerización del microtúbulo: el extremo de β -tubulina unido a GTP genera un microtúbulo estable con carga positiva, cuando la enzima GTPasa se une a GTP hidroliza la molécula convirtiéndola a guanidin difosfato (GDP) con carga negativa que

crea tensión en las paredes del polímero conduciendo la despolimerización. La despolimerización de los microtúbulos también es promovida por las enzimas de corte de microtúbulos (Alazami *et al.*) (Extraído de (Romaniello *et al.*, 2018)).

Organización de los microtúbulos en las células nerviosas

El citoesqueleto de las neuronas está formado principalmente por microtúbulos y filamentos de actina. Las neuronas son estructuras polares y el transporte de cargas es realizado por las proteínas asociadas a microtúbulos o MAP. Las quinesinas, dineínas y miosinas son proteínas motoras de tipo MAP, fundamentales para llevar a cabo los procesos neuronales. Las MAP transportan la carga para propagar un impulso nervioso, se desplazan en el axón y las dendritas a través de los filamentos de tubulina. Las MAP transportan varios tipos de vesículas membranosas y complejos de proteínas. En las dendritas la polaridad de los microtúbulos es mixta, los Mts están orientados en ambas direcciones para realizar: el transporte anterógrado que va del cuerpo celular a la periferia y el transporte retrógrado que se realiza de la periferia al cuerpo celular. Los microtúbulos ubicados en el axón solo están orientados con el extremo positivo a la periferia para realizar el transporte anterógrado (Hirokawa *et al.*, 2010). Se sabe que las mutaciones en tubulina o MAP pueden interrumpir las interacciones entre ambos generando defectos cito esqueléticos relacionados a enfermedades (Niwa *et al.*, 2013) (Figura 5).

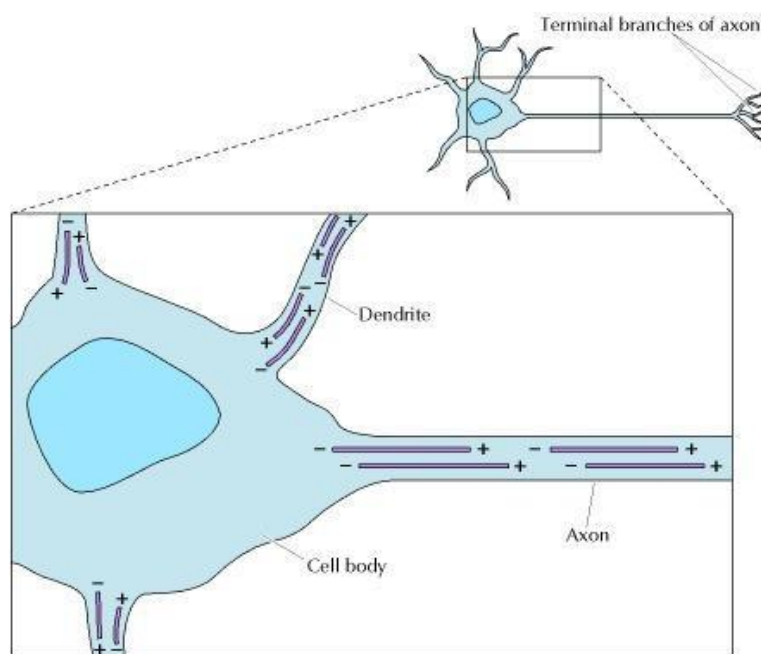


Figura 5. Polaridad neuronal. Los microtúbulos ubicados en las dendritas están orientados con la polaridad mixta permitiendo el transporte anterógrado con las cargas positivas orientadas hacia la periferia y el transporte retrógrado con las cargas positivas orientadas al cuerpo celular. En el axón los microtúbulos solo están orientados para transportar las cargas en sentido anterógrado, enviando los impulsos nerviosos a otras neuronas. Imagen adoptada de (Cooper and Hausman, 2000) .

Tubulinas

La tubulina es una proteína dimérica que compone a los microtúbulos (MTs) (Cooper and Hausman, 2000). Las tubulinas constituyen una superfamilia que además de las α - y β -tubulinas también está conformada por las de tipo γ -, δ -, ϵ -, η -, ζ -, ι -, θ - y κ -tubulinas, siendo estas últimas menos relacionadas evolutivamente con las de tipo α - y β -tubulinas (Figura 6) (McKean *et al.*, 2001, Dutcher, 2001, Dutcher, 2003, Ludueña and Banerjee, 2008).

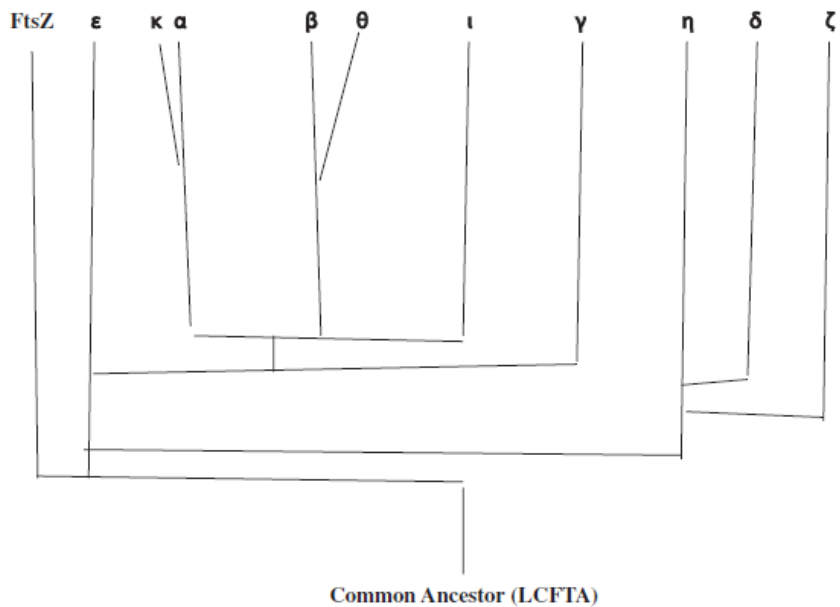


Figura 6. Hipótesis evolutiva de la superfamilia tubulina. La α - y β -tubulina convergen de un ancestro en común, esta cercanía significa que están más relacionadas evolutivamente que la γ - tubulina, sin embargo las tres tubulinas (α , β y γ) provienen de un ancestro en común, (Dutcher, 2003).

Las α - y β - tubulinas son componentes principales de los microtúbulos y generalmente son polimerizadas por la γ -tubulina (Moritz and Agard, 2001, Leguy *et al.*, 2000). La γ -tubulina desempeña un papel importante en la nucleación para el ensamblaje de los microtúbulos (Marchler-Bauer *et al.*, 2016). Las tubulinas α - y β - son idénticas en un 40% de su secuencia. En su estructura tienen tres regiones según su función: la región de unión en el extremo nucleótido amino-terminal, una región intermedia y la región carboxi- terminal que

probablemente constituye la superficie de unión para las proteínas motoras (Marchler-Bauer *et al.*, 2016). Existen diferentes isoformas para α - y β - tubulina que difieren en la secuencia de aminoácidos y codifican para diferente gen (Sullivan and Cleveland, 1986, Ludueña, 1997). Los Mts compuestos de dímeros con diferentes isotipos cambian su dinámica y unión a otras proteínas (Panda *et al.*, 1994). En el humano, las isoformas de tubulina se expresan diferencialmente en los tejidos (Roach *et al.*, 1998). En 2010 se realizó un estudio para conocer la expresión de las isoformas de β -tubulina en el tejido humano: tumoral y no tumoral. Se cuantificó la expresión de ARNm de las isoformas codificadas por los genes: TUBB (clase I), TUBB1 (VI), TUBB2A (IIa), TUBB2B (IIb), TUBB2C (IVb), TUBB3, TUBB4A (IVa) y TUBB6 (V)). Las tubulinas con mayor expresión en el cerebro fueron: TUBB2A, TUBB2B, TUBB3, TUBB y TUBB4A, lo cual sugiere que dichas Isoformas neuronales son específicas dado que en otros tejidos se expresan, pero a una concentración menor. La TUBB4A es la isoforma de mayor expresión en el cerebro y se expresa a menor concentración en tejidos como: el bazo, los testículos y glándulas suprarrenales (Figura 7) (Leandro-García *et al.*, 2010).

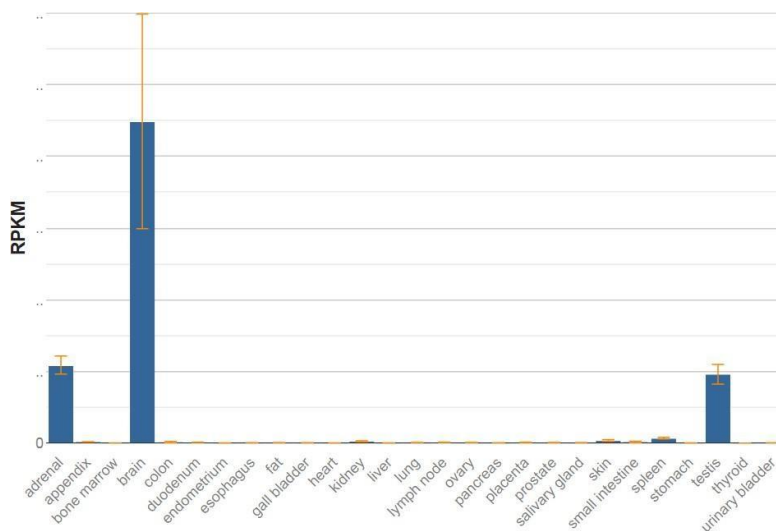


Figura 7. Expresión cuantitativa de la proteína TUBB4A en el humano medido en RPKM (lecturas por millón de kilobase) (Fagerberg *et al.*, 2014).

El gen TUBB4A

El gen TUBB4A presenta diversos nombres en la literatura que pueden causar confusión. Se pueden encontrar sinónimos como TUBB4, DYT4 o beta-5, aunque el único símbolo aprobado en la nomenclatura es: TUBB4A. El gen TUBB4A se encuentra ubicado en el cromosoma 19 en la región 6,494,319 - 6,502,848 pb de la secuencia NC_000019.10 (Figura

8) <https://www.genenames.org/data/genegroup/#!/group/778>.

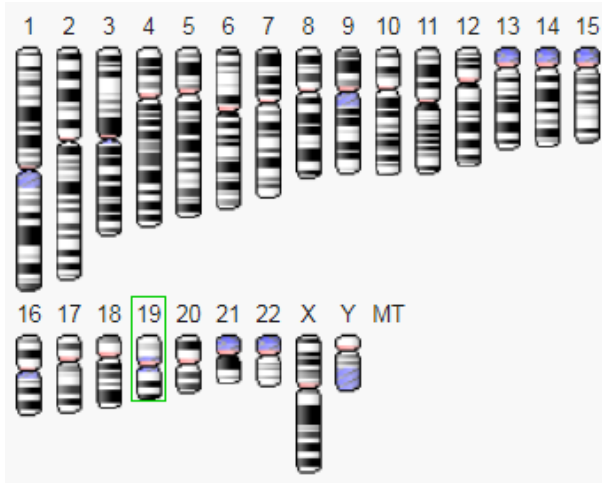


Figura 8. Ubicación del gen TUBB4A en el cromosoma 19 señalado con el recuadro verde.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/?context=gene&acc=10382>

El gen TUBB4A está formado por cinco exones separados por secuencias intrónicas. El gen posee cinco Isoformas incluidas en la región exónica señalada del gen (Figura 9).

```

5041 cccccaccg caaacccagat cgcgctccg gagccccag cccaactgga gggctcggg 11521 agttactagt attcaactac tagaggccct ccagggtggt gagagacaga gtcagggtt
5101 ttactgcaag gattctggcg aatgaggtct aaatagaatg agaaaggggg ctgcggaccg 11581 ggggctcccc ataactgcat gtgtgtcccc tccccctccc tctctaggcc aatccggagc
5161 agaaactgag gcaaggccctg ggcggggagg gtggaggcta agggggaggg gcaggacttc 11641 gggcaacaac tgggcaagg ggcactcac ggaggggcga gagctggtgg acgctgtcct
5221 tcagatgctt gtttaccagg cgcctcccct cctctccctcg cccaattctt gcgggtgacc 11701 ggaactagtc cggagaggg ccgagagctg ggaactgctt cagggtcttc agctgacctc
5281 aagcctggtc gggggtggg acgggggaga ctgcaactgtt gctccctaa ggggctccac 11761 ctgctggg ggtggcaagg ggtccgggat gggcaactg ctcaatcaga agatccgca
5341 ccccaaggca ggggtcggag cactgtgggt cccggacttc tctggaggc cccctgggga 11821 ggaagtccca gaccgcatca tgaacactt cadcgtgtgt cccctgacca aagtgtcaga
5401 gggaggtccc tgcaccact cccccacc cagccccctc catcatcccg gggcgggacc 11881 cacggtggtg gagccttaca acccaactt gctctgcat cagctggtgg agaatcagg
5461 aagggcgga ggggagggt gaccggcctg gacgctgac cgcgccgctc ataatagcggc 11941 tgagacctac tgcactgaca accgagcact ctacgactc tgtttccga cctcaagct
5521 tccggggggc gcagggaccg tctctccgct tctctccgctc atcttccacc ctgcgcccgc 12001 gaccaccccc acctacggg acctcaacca cctggtgtcg gccaccatga ccgggtcac
5581 ccgcaactcc ccgctcctg gccaccgccc ccgctccacc cctcagcgcc accgcccctg 12061 cactgcccct cgcttcccgg gccagctgaa ccgagacctc gcgaactgga ccgtcaaat
5641 gggagatcgt gcaactcga gcccggcagt ggggcaacca gatccgggccc aaggtgctcg 12121 ggttccccct cctgcctcgc acttcttcat gccgctctc cagccccctg ccagccggg
5701 ggaacgggg ccgggggagg cagtggggc cccggggagc acccggggtt cggtccccgg 12181 cagccagcag taccgggccc tgacgtgccc cgagctcacc cagcagatgt tcgatgccaa
5761 agcaccggc aacctgggag tctttggaaa ggaatgaggt ccccaggagg ccagcgcgcc 12241 gaaatgatg gcggcgtgac acccgggcca ccgcccctac ctgacctggt ccgctgttt
12301 cggggccgc atgtccatga aggagtgga cgagcagatg ctgagctgct agacaagaa
12361 cagcagctac tctgtgagt ggatcccaaa caacgtgaa agggcctgt gcgacatccc
12421 gccccgggc ctgaagatgg ccggacatt catcggaac agcaaggcca tccaggagct
12481 gttcaagcc atctccgagc agttcacgc catgctccgg ccgaagcct tcttgactg
12541 gtaccgggc gaggcatgg acgagatga gttcaaccgg gcccaagca acatgaatga
12601 cctggatctc gactaccagc agtaccaga cggcaaggcc gaggagggc agttcagga
12661 ggaagggag gaggaggtgg cctaggtgct tcccactgct tcccactgct cccctcgag
12721 ctctgactc ttgatccgtc agggcccca tctctgaacc ctagagcccc gotttccctc

```

Figura 9. Secuencia parcial del gen TUBB4A, se muestran los 5 exones del gen sombreados con color amarillo.

El gen TUBB4A está conservado en eucariotas (HomoloGene: 55952). En el humano, esta proteína se expresa altamente en cerebelo, putamen y sustancia blanca (Kancheva *et al.*, 2015). Las mutaciones en TUBB4A causan defectos funcionales en la dinámica y la estabilidad de los microtúbulos (Kancheva *et al.*, 2015), se presentan fenotipos con distonia (Lohmann and Klein, 2014), torsión y leucodistrofia hipomielinizante en la mayoría de los casos (Blumkin *et al.*, 2014, Kancheva *et al.*, 2015, Miyatake *et al.*, 2014, Purnell *et al.*, 2014, Simons *et al.*, 2013).

Capítulo I: “Diagnóstico genético en fenotipo H-ABC”

Antecedentes

Leucoencefalopatías

Las leucoencefalopatías son aquellas enfermedades que afectan la materia blanca cerebral. Los trastornos hipomielinizantes están incluidos en estas enfermedades ya que se caracterizan por tener un déficit de mielina (Van Der Knaap *et al.*, 1999, Van der Knaap *et al.*, 2002). Existen leucoencefalopatías con origen desconocido, las cuales no pueden diagnosticarse de manera definitiva pues no coinciden con ninguna enfermedad reportada. Estas leucoencefalopatías se pueden presentar tanto en la infancia como en la etapa adulta y, son enfermedades que pueden heredarse o adquirirse. Las leucoencefalopatías infantiles de origen desconocido son enfermedades muy raras. Si existe probabilidad de herencia no se puede diagnosticar en el embarazo, y resultan un problema tanto para los pacientes como para los padres porque no se le puede dar un tratamiento ya que no se conoce la causa (Van Der Knaap *et al.*, 1999). Para conocer el origen de estas patologías se propuso un primer paso que fué desarrollar un modelo de análisis con base en diferentes variables que pudieran clasificar las imágenes de las resonancias magnéticas (RM) de los pacientes diagnosticados con leucoencefalopatías de origen desconocido. Como resultado se obtuvieron 7 categorías de las cuales la hipomielinización resultó la categoría más grande (Van Der Knaap *et al.*, 1999). Esta contribución tuvo como objetivo tener una referencia de las nuevas enfermedades para que los neuroradiólogos y neurólogos pediatras pudieran diagnosticarlas correctamente, y a través de la investigación conocer el origen de las mismas.

Hipomielinización con atrofia en los ganglios basales y cerebelo

En 2002 Van Der Knaap describió por primera vez la enfermedad conocida como: “hipomielinización con atrofia en los ganglios basales y cerebelo” atribuyéndose el acrónimo H-ABC (Van der Knaap *et al.*, 2002). Una leucodistrofia rara y de naturaleza esporádica que se distingue por su inicio en la etapa infantil. Identificó patrones en un grupo de siete pacientes que compartían anomalías en los movimientos extrapiramidales,

ataxia y espasticidad; incluyendo deterioro motor y cognitivo. Ningún paciente tenía un familiar afectado. Las imágenes de RM fueron consistentes en todos los pacientes presentando hipomielinización, atrofia de los ganglios basales y el cerebelo (Van der Knaap *et al.*, 2002). La atrofia del vermis y de los ganglios basales puede ocurrir de forma temprana o tardía de acuerdo al proceso degenerativo de la enfermedad (Otero Domínguez *et al.*, 2018). La atrofia del putamen puede presentarse de forma tardía o puede estar ausente en H-ABC y cuando el putamen se encuentra sano, no debe descartarse el diagnóstico de H-ABC si hay otros criterios que lo indiquen (Ji *et al.*, 2018). También se ha reportado un caso clínico que además de padecer la sintomatología clásica de H-ABC, se informaron nuevos hallazgos como la falta de mielina en los nervios ópticos, gliosis severa y pérdida desigual de axones en H-ABC no reportados previamente en la descripción de Van Der Knaap en 2002 (Van der Knaap *et al.*, 2002, Joyal *et al.*, 2018)

Diagnósticos genéticos en pacientes diagnosticados clínicamente con H-ABC

Con el motivo de conocer la mutación responsable de su fenotipo neurodegenerativo, se han realizado diagnósticos genéticos a pacientes diagnosticados clínicamente con H-ABC y otros con leucodistrofia hipomielinizante. En 2013, Simons *et al.*, realizaron un estudio genético aislando el exoma de 11 pacientes diagnosticados con H-ABC. Los resultados de la secuenciación sugieren que la mutación es dominante *de novo* y está asociada al gen TUBB4A presentando un cambio de nucleótido que modifica al ácido aspártico por asparagina en el aminoácido 249 (p.Asp249Asn) (Simons *et al.*, 2013). Por su parte, Hamilton *et al.*, realizaron un estudio genético en 42 pacientes diagnosticados con H-ABC, 25 de ellos presentaron la mutación heterocigótica p.Asp249Asn en TUBB4A, ya descrita (Simons *et al.*, 2013) y los 16 pacientes restantes presentaron 13 mutaciones de novo y no reportadas hasta entonces en Tubb4a: p.Arg2Trp, p.Arg2Gln, p.Cys239Phe, p.Gly244Ser, p.Gly244Val, p.Met323Arg, p.Ala352Thr, p.Cys354Tyr, p.Phe367Ile, p.Phe367Leu, p.Met388Val, p.Met388Thr, p.Met388Ile. En otro estudio, Miyatake *et al.*, realizaron la secuenciación del exoma en 8 pacientes, 6 de ellos fueron diagnosticados clínicamente con H-ABC y 2 sin clasificar. Dos de los pacientes con H-ABC presentaron la mutación p.Asp249Asn en heterocigosis ya descrita (Simons *et al.*, 2013). El resto presentó cinco nuevas mutaciones no sinónimas en heterocigosis p.Glu410Lys, p.Glu410Lys, p.Arg2Gln, p.Met388Val, p.Asp249Asn p.Thr178Arg, p.Arg262His. La mutación p.Glu410Lys, estaba presente en los dos pacientes sin clasificar, lo que sugiere una variante de fenotipo patológico causado por la anomalía

TUBB4A; todas las mutaciones fueron de novo. En 2014 fueron identificadas dos mutaciones nuevas con origen de novo: p.Gly224Ser para paciente con H-ABC y p.Phe394Cys para paciente con leucodistrofia hipomielinizante, ambos en TUBB4A (Carvalho *et al.*, 2014). Shimojima *et al.*, realizaron un estudio e identificaron la mutación de novo en p.Arg262His asociada al fenotipo H-ABC, ya descrita (Miyatake *et al.*, 2014); sin embargo, el paciente no mostró características neurológicas que sugirieran el fenotipo H-ABC. En otro estudio, Erro *et al.*, realizaron el diagnóstico clínico en cuatro pacientes, basado en los criterios de RM de H-ABC, debido a que el fenotipo que presentaron los pacientes no era específico; a través del diagnóstico genético identificó la mutación común p.Asp249Asn en dos de ellos y dos nuevas mutaciones en el resto p.Ala314Val y p.Met300Ile; todas las mutaciones fueron heterocigotas y con origen de novo (Erro *et al.*, 2015). En 2018 otro estudio en 119 pacientes con trastornos hipomielinizante, identificó a 3 pacientes con H-ABC con mutación en el gen TUBB4A: las mutaciones p.V180M, p.W325L fueron nuevas y p.R262H ya descrita (Miyatake *et al.*, 2014, Ji *et al.*, 2018). En 2018 fue reportado un estudio en el que secuenciaron el gen TUBB4A de un paciente que presentaba características de H-ABC, identificó la mutación típica p.Asp249Asn en heterocigosis, sin embargo no se conoce si el origen fue de novo (mutación adquirida) ya que los padres no fueron estudiados (Otero Domínguez *et al.*, 2018). En el mismo año, se reportó otro estudio donde se secuenció el gen TUBB4A de un paciente que presenta características consistentes con H-ABC y se identificó la mutación p.Thr178Arg (Miyatake *et al.*, 2014, Joyal *et al.*, 2018). Recientemente se localizó el primer caso en México de un paciente, cuya resonancia magnética presentó características de H-ABC (Figura 10).

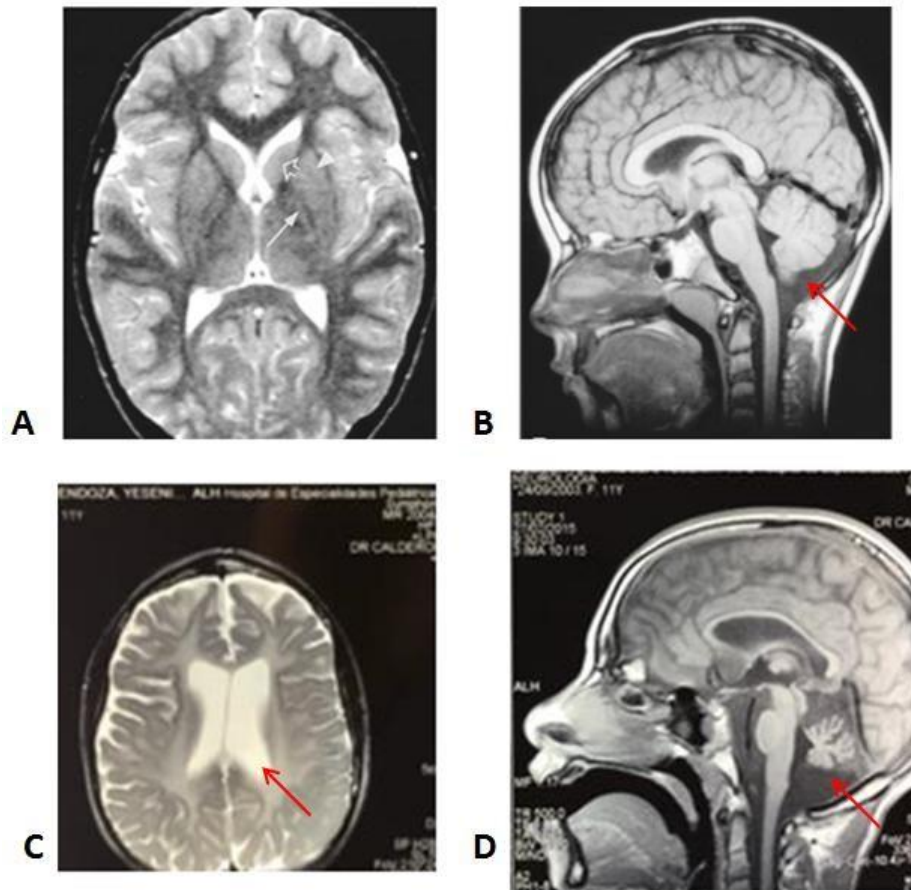


Figura 10. Imágenes A) y B), corresponden a la RM de un niño sano de 8 años (Van der Knaap *et al.*, 2002). A) Imagen axial en T2, la materia blanca mielinizada tiene baja intensidad de señal. Se muestra el tamaño normal de los ganglios basales: el putamen es un núcleo grande (punta de flecha), el globo pálido es pequeño (flecha sólida) y el núcleo caudado indicado con flecha abierta. B) Imagen sagital en T1, se muestra el tamaño normal del vermis cerebeloso (flecha roja). Imágenes C) y D), corresponden a la RM del paciente diagnosticado como probable tubulinopatía. C) Imagen axial en T2, hiperintensidad de la sustancia blanca indica ausencia de mielina (hipomielinización), los ganglios basales no son visibles, lo que señala que se encuentran atrofiados. D) Imagen sagital en T1, muestra cerebelo atrofiado (flecha roja).

Justificación

Las leucodistrofias relacionadas con TUBB4A comprenden un espectro fenotípico de muy reciente descripción. Por tal motivo, existen muy pocos casos reportados en la literatura y se sabe muy poco de su fisiopatogenia. Se ubicó el caso de un paciente con datos clínicos que sugieren que podría tratarse de H-ABC. Las características observadas en las RMs son el principal recurso para impulsar el análisis genético (Erro *et al.*, 2015). La

literatura reporta que la enfermedad H-ABC está asociada a una mutación en TUBB4A en *Homo sapiens*, también puede incluir: retraso en el desarrollo, hipotonía, nistagmo, deterioro de la función motora (Ji *et al.*, 2018). Sin embargo, estas características neurológicas y neurorradiológicas son variables entre los pacientes con H-ABC, en muchos de los casos los pacientes no presentan los criterios de la enfermedad, dificultando la predicción del pronóstico y diagnóstico genético (Shimojima *et al.*, 2015). Este estudio tiene una importancia fundamental ya que busca realizar el diagnóstico de precisión en quien, hasta nuestro conocimiento, sería el primer caso reportado con este tipo de patología en México.

Hipótesis

La patología presente en el paciente se debe a una mutación en el gen TUBB4A.

Objetivos

Objetivo general

Determinar el estado del gen TUBB4A en un caso diagnosticado clínicamente con H-ABC mediante diagnóstico genético.

Objetivo particular

- I. Diseñar *primers* específicos para TUBB4A.
- II. Evaluar la especificidad de los *primers* a través del análisis de expresión utilizando DNA genómico por PCR semicuantitativo para cada amplicón.
- III. Optimizar la PCR mediante enzimas de alta fidelidad
- IV. Optimizar la PCR mediante agentes desnaturizantes
- V. Determinar si el gen TUBB4A se encuentra mutado en el paciente diagnosticado mediante secuenciación.

Materiales y métodos

Métodos para la identificación y análisis de trastornos de migración neuronal.

La descripción de las RMs son el primer paso para relacionar las características de imagen con los trastornos de la función de los microtúbulos en las neuronas (Mutch *et al.*, 2016). Los patrones presentes en las RMs de los pacientes permiten clasificar las enfermedades y a través del análisis genético se detecta el tipo de mutación y el gen causante de la enfermedad (Cuesta *et al.*). Es fundamental el previo asesoramiento genético en los pacientes, considerando que distintos tipos de mutaciones pueden afectar el mismo gen (Goswami and Harada, 2020). La tubulina tiene el potencial de modular la estructura, la dinámica y las interacciones de los microtúbulos y de las proteínas asociadas (MAPs) (Chakraborti *et al.*, 2016). Las mutaciones en los genes de tubulinas (TUBA1A, TUBB2A, TUBA8, TUBA3E, TUBB2B, TUBB3, TUBB4A, TUBB5, TUBG1) afectan las categorías de neurogénesis, migración y rutas axonales (Mutch *et al.*, 2016). El diagnóstico genético implica la detección de mutaciones patogénicas en muestras de ADN o ARN a través de técnicas moleculares (Korf and Pagon, 2003). Se puede utilizar cualquier tejido accesible como fuente de ADN, por ejemplo: sangre periférica o las células de revestimiento bucal (Seidman *et al.*, 1995). Las herramientas moleculares permiten realizar un diagnóstico genético desde un solo gen hasta la secuenciación del exoma (WES) y genoma completo (WGS) (Cuesta *et al.*). El enfoque de cada herramienta molecular varía dependiendo del tipo de mutación (Goswami and Harada, 2020).

Las herramientas moleculares implementadas comúnmente en el diagnóstico genético de los trastornos de migración neuronal (TMN) son: 1) Los *microarrays*: sirven para la identificación de deleciones, duplicaciones y otras malformaciones en la estructura. Consiste en hibridar el ADN del paciente con ADN sano de referencia. El *microarray* está diseñado para proporcionar redundancia con alta sensibilidad y especificidad para la detección de trastornos bien caracterizados (Cheung *et al.*, 2005). 2) El análisis de *microarray* cromosómico (CMA): se utiliza para detectar variación en el número de copias genómicas basadas en matrices. 3) Array de hibridación genómica comparativa (aCGH):

es un método para conocer el número de copias (CNV) de un *loci*, comparando la muestra de análisis con una de referencia. También se pueden detectar variaciones como deleciones, duplicaciones y aneuploidía cromosómica. Los métodos citogenéticos tradicionales como el cariotipo y FISH proporcionan tanto la detección del número de copias como la ubicación espacial del desequilibrio. Aunque aCGH tiene mayor rendimiento y cobertura que los métodos citogenéticos tradicionales debe considerarse un método complementario, ya que la técnica es visible pero no identificable citogenéticamente (Miller *et al.*, 2012, Hamilton *et al.*, 2014). Por ejemplo, aCGH puede identificar dos áreas de desequilibrio cromosómico debido a una translocación, pero solo FISH puede mostrar la ubicación de cada segmento de la translocación (Miller *et al.*, 2012). Los laboratorios clínicos ofrecen pruebas de aCGH con una variedad en el diseño de plataformas y cobertura. Un paciente que realice el ensayo de un gen en laboratorios diferentes podría obtener resultados distintos debido a la falta de estandarización (Shaffer *et al.*, 2007).

4) Análisis por PCR: es más frecuente el uso de la PCR para la identificación de mutaciones puntuales que por análisis de hibridación *Southern blot* (Seidman *et al.*, 1995). El análisis de PCR se realiza en genes donde se sospecha el cambio de base responsable de la enfermedad, en la cual se diseñan primers específicos para amplificar la región de interés. La mutación no sinónima es cuando el cambio de base codifica para un aminoácido distinto y, la mutación sinónima es cuando el cambio de base codifica para el mismo aminoácido. La detección de mutación puntual por RT-PCR se realiza con análisis del ARNm del gen candidato, la enzima transcriptasa reversa genera la cadena complementaria de ADN. Un cambio en el tamaño de la banda amplificada indicaría una deleción o inserción. Aunque debe considerarse la existencia de *splicing* alternativos, que pueden conducir a la heterogeneidad de tamaño del ARNm. La PCR se realiza para genes específicos, seguido de la secuenciación del ADN es la forma más directa de discriminar una secuencia sana (Korf and Pagon, 2003).

5) La secuenciación del exoma clínico: involucra la fracción de ADN que codifica proteínas de los genes involucrados en enfermedades clínicas. El estudio del exoma es ideal para casos de pacientes que a pesar de la búsqueda exhaustiva se desconoce el gen mutado. El análisis de exoma filtrado se realiza a través de un panel génico donde se eligen genes potenciales al fenotipo de interés, es decir, se conoce la enfermedad que causa si los genes presentan mutación. El panel génico se puede realizar con diseño propio o elegir un panel comercial compatible (Cuesta *et al.*). El análisis de paneles con genes involucrados en el desarrollo cortical representa una herramienta rápida y rentable para el diagnóstico genético de estas malformaciones (Parrini *et al.*, 2016), el diagnóstico en genes de tubulina ha resultado una

identificación más rápida (Alazami *et al.*, 2015, Poirier *et al.*, 2013, Simons *et al.*, 2013). También existe el exoma en tríos, consiste en analizar el exoma del paciente y sus progenitores, lo que facilita la comprensión y herencia del fenotipo patológico. 6) Secuenciación del genoma completo (WGS): la secuenciación de próxima generación (NGS) se usa cada vez más en el entorno clínico, ya que puede detectar una serie de anomalías, desde mutaciones puntuales hasta reordenamientos cromosómicos, así como aberraciones dentro del transcriptoma (Goswami and Harada, 2020). La prueba clínica de WGS ha demostrado ser exitoso en la identificación de las causas genéticas de enfermedades no diagnosticadas y trastornos raros, la precisión de los resultados depende del análisis bioinformático e interpretación clínica. Cada laboratorio valida el rendimiento de sus métodos y el tiempo de análisis generalmente es de 3 a 4 meses. Finalmente, para interpretar las variantes del genoma es necesario evaluar el posible efecto patogénico en el contexto del fenotipo de cada paciente, se sugiere una estrecha interacción entre los médicos de referencia y los biólogos moleculares (Parrini *et al.*, 2016, Song *et al.*, 2018).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Kary Mullis descubrió la técnica "reacción en cadena de la polimerasa" (PCR) (Mullis *et al.*, 1986). La PCR es una herramienta en biología molecular que permite amplificar *in vitro*, secuencias de ácidos nucleicos en un corto tiempo (Kuslich *et al.*, 2018).

La PCR se realiza preparando una mezcla de reactivos en un tubo para PCR. Este tubo debe contener la plantilla de ADN que se desea amplificar, el par de *primers* complementarios a la secuencia de ADN, la ADN polimerasa, los cuatro trifosfatos de desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), una sal con un catión divalente (Mg^{2+}) y un amortiguador con sal simple (KCl). Esta mezcla se introduce en una serie de ciclos con cambios en el tiempo y la temperatura, generando la amplificación exponencial del producto (Kuslich *et al.*, 2018).

Las etapas de la PCR son: desnaturalización, alineación y extensión. La etapa de desnaturalización: la mezcla se calienta de 92 ° a 96 ° C y la duración suele ser de 0.5 – 2 min dependiendo de la longitud de la plantilla y su contenido de GC (%). También debe conocerse la temperatura óptima de desnaturalización de la ADN polimerasa que se utiliza, ya que si el tiempo o temperatura de desnaturalización es mayor al tolerado se puede perder actividad de la enzima. La temperatura inicial no debe superar los 96 ° C. En esta etapa se promueve la separación de la doble cadena de ADN para transformarla en dos cadenas sencillas (Kuslich *et al.*, 2018, Najafov and Hoxhaj, 2006). Adicionalmente, se

recomienda realizar una desnaturalización inicial antes de comenzar el primer ciclo, para asegurar la degradación de enzimas potencialmente dañinas (por ejemplo, las DNAsas)(Figura 11 y Figura 12) (Najafov and Hoxhaj, 2006).

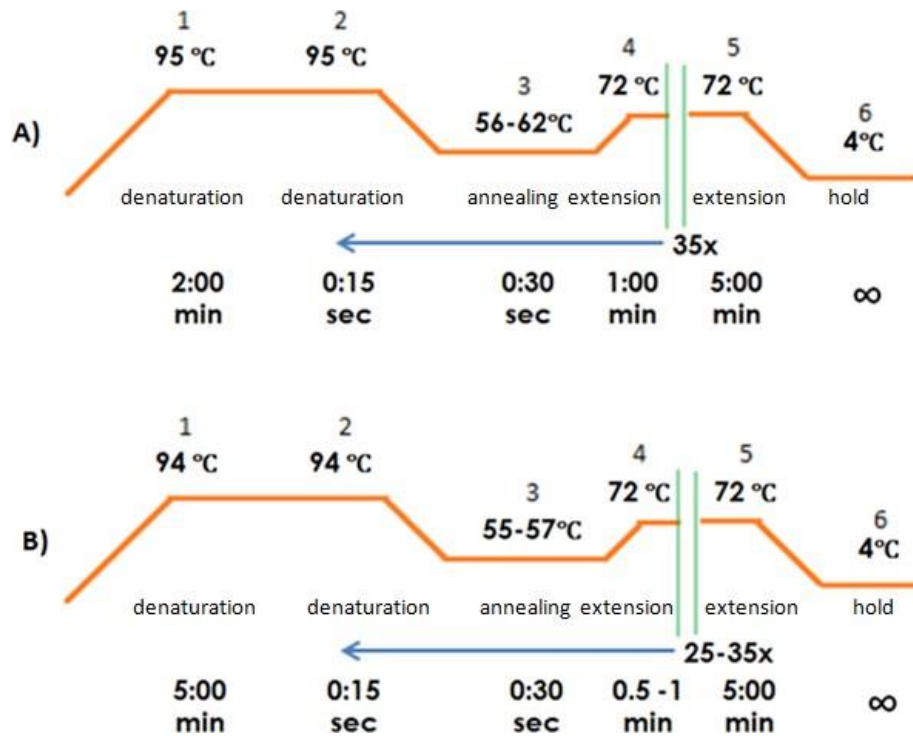
La etapa de alineación: la temperatura se modifica con 4 ° C menor a la temperatura de fusión de los *primers*, y varia de 55 a 60 ° C permitiendo la hibridación de los oligos complementarios a la cadena de ADN sencilla (Figura 11 y Figura 12) (Najafov and Hoxhaj, 2006, Kuslich *et al.*, 2018).

La etapa de extensión: la temperatura óptima es de 72 ° C, aunque hay ADN polimerasas que pueden tener una temperatura óptima de extensión más baja o alta. La duración de la extensión depende de la longitud de la secuencia objetivo (Tabla 1). Generalmente es de 72 ° C / 5-10 min, obteniendo así, las secuencias de doble cadena conocidas como amplicones (Figura 11 y Figura 12) (Najafov and Hoxhaj, 2006, Kuslich *et al.*, 2018).

Tabla 1. Tiempos de extensión para secuencias objetivo de varias longitudes, obtenido de (Najafov and Hoxhaj, 2006).

Secuencia objetivo (kb)	Tiempo de extensión (min)
< 1	0.5-1.0
1-5	3
6-9	6
10-20	12

Los pasos de desnaturalización, alineación y extensión se repiten típicamente de 30 a 40 ciclos (Kuslich *et al.*, 2018). Si la plantilla es ADN genómico, es mejor establecer el número de ciclos de 33 a 35 ciclos. Si la plantilla es un plásmido, 25 ciclos son suficiente en la mayoría de los casos dependiendo de la aplicación posterior (Figura 11) (Najafov and Hoxhaj, 2006).



A) Figura 11. Diagramas de ciclos de PCR estándar. A) obtenido y modificado de (Kuslich *et al.*, 2018), B) obtenido y modificado de (Najafov and Hoxhaj, 2006). Etapa 1 desnaturalización: para iniciar el ciclo, se recomienda realizar una desnaturalización previa para degradar enzimas dañinas. El aumento de la temperatura promueve la apertura de la cadena de ADN molde en dos cadenas sencillas, la temperatura máxima es de 96 ° C, dependiendo la tolerancia que tenga ADN polimerasa sin afectar su actividad enzimática. La etapa 2 de desnaturalización se abre la cadena de ADN, la etapa 3 de alineación se adhieren los oligos a la cadena sencilla, y la etapa 4 de extensión se polimeriza la cadena sencilla generando la cadena de doble cadena conocida como amplicón, estas etapas (2,3 y 4) se repiten de 25 a 40 veces. Se sugiere 25X para ADN plasmídico, y de 30-35x para ADN genómico (Kuslich *et al.*, 2018, Najafov and Hoxhaj, 2006). La etapa 5 de extensión final, ocurre al terminar los ciclos anteriores y es la última etapa de la reacción. La etapa 6 se refiere al tiempo donde ya finalizada la reacción, el termociclador baja la temperatura a 4° C para conservar la muestra amplificada.

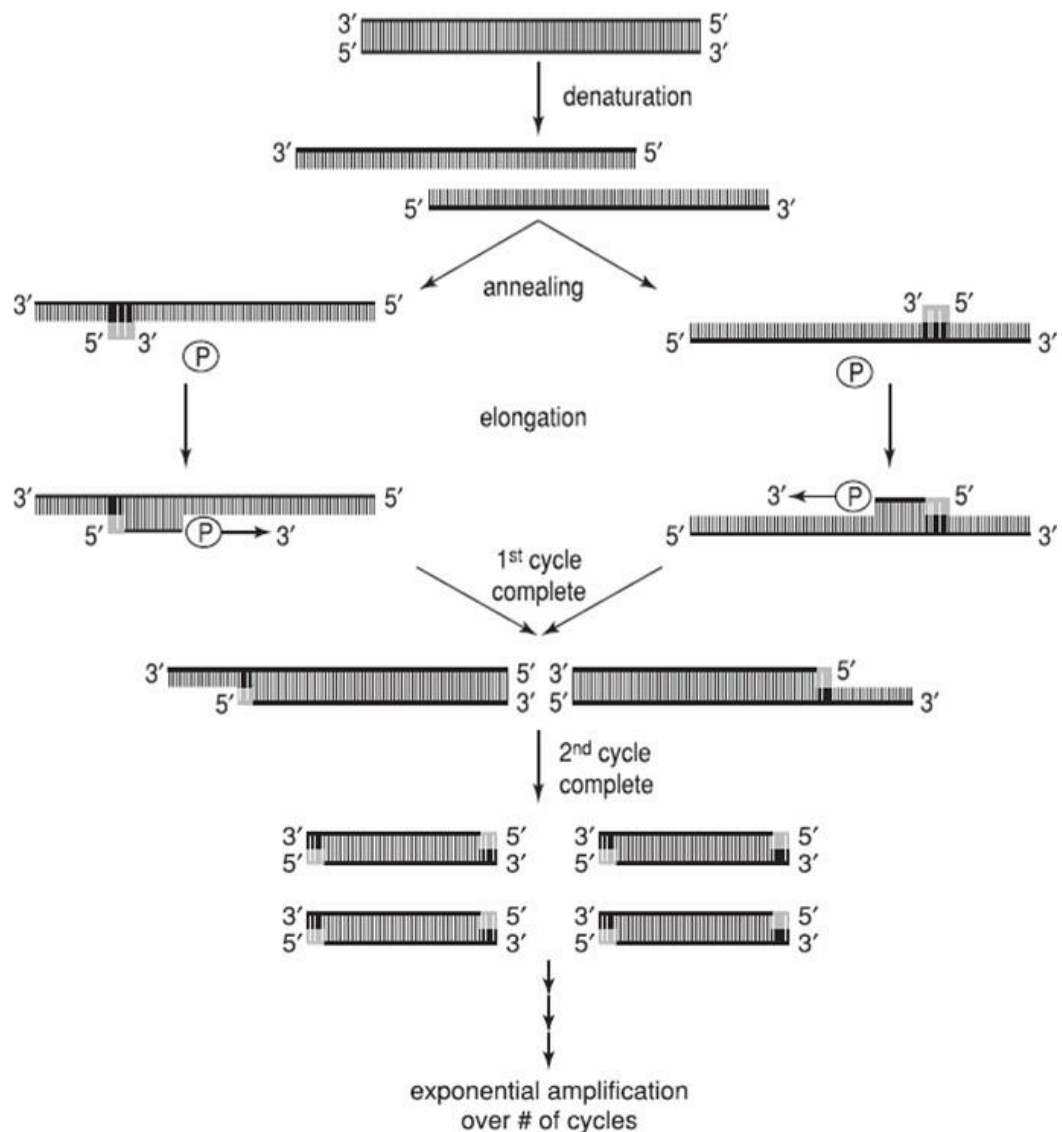


Figura 12. Pasos de la PCR obtenido de (Kuslich *et al.*, 2018).

Variaciones de PCR

Actualmente se han desarrollado distintos métodos de PCR que cumplen con necesidades específicas para los diferentes estudios. A continuación, se muestra una tabla con la descripción general para cada variante de PCR (Tabla 2). Más adelante se realiza una descripción detallada de la PCR multiplex, ya que es fundamental conocer esta variante de PCR para entender la propuesta que se provee en el Capítulo 2 de este estudio.

Tabla 2. Tipos de PCR, extraída y modificada de (Kuslich et al., 2018)

Aplicación	Descripción	Referencia
Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)	La técnica AFLP es una técnica de huella genética de fingerprinting que requiere la digestión del genoma con enzimas de restricción seguido de la ligación de espaciadores especiales con colas universales que eliminan el sitio de restricción y después se amplifican por PCR con conjuntos especiales de cebadores.	(Vos et al., 1995)
Alu-PCR	Alu PCR es una técnica rápida y fácil de realizar "fingerprint DNA" basada en el análisis simultáneo de muchos loci genómicos flanqueados por elementos repetitivos de Alu, que permite la detección de polimorfismos genéticos y mutaciones en genomas humanos y primates.	(Cardelli, 2011)
PCR asimétrica	Esta PCR se usa para producir mayor número de copias de una hebra de la cadena, generada por tener mayor concentración del primer que corresponde a la cadena deseada.	(Shyamala & Ames, 1989)
PCR clonación	Clonación facilitada de regiones de ADN específicas por amplificación utilizando primers específicos con una secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción añadida al extremo 5' de manera que los amplicones se digieren con la enzima de restricción y se insertan en el vector de clonación con ese sitio de restricción.	(Scharf, Horn, & Erlich, 1986)
PCR de colonia	Cribado de colonias bacterianas para secuencias específicas por toma de células de una colonia en la placa de cultivo y colocado directamente en tubo de PCR.	(Riley, Woodman, & Stevenson, 2008; Zon, Dorfman, & Orkin, 1989)
PCR primer degenerado (DOP-PCR por sus siglas en inglés)	Uso de primers degenerados con baja temperatura de alineación para permitir que el ADN de especies independiente se amplifique.	(Carter, Bebb, Nordenskjo, Ponder, & Tunnacliffe, 1992)

PCR de visualización diferencial (DD)	Identificación de cambios en la expresión de genes de diferentes tejidos, se utilizan primers específicos para la PCR con transcriptasa inversa (RT) y los productos se analizan en un gel de alta resolución	(Liang & Pardee, 1992)
PCR inversa (IPCR)	Este método amplifica secuencias de ADN que flanquean una región de secuencia conocida. Se utilizan primers orientados en sentido inverso y la plantilla de los primers tiene un fragmento de restricción que se ha ligado sobre sí mismo para formar un círculo.	(Ochman, Gerber, & Hartl, 1988)
ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)/PCR con oligonucleótidos arbitrarios (AR-PCR)	Amplificación con primers de secuencia aleatoria. Permite tomar fingerprinting del genoma sin necesidad de conocer las secuencias genómicas, a menudo se realiza primero en bajo y luego en alto rigor proporcionando fingerprinting más extensas para diferenciar especies.	(Williams, Kubelik, Livak, Rafalski, & Tingey, 1990)
Mutaciones aleatorias por PCR	Inducción de mutaciones aleatorias dentro de una región de ADN implementando una PCR propensa a errores cambiando Mg^{2+} por Mn^{2+} en el buffer de reacción.	(Lin-Goerke, Robbins, & Burczak, 1997)
Amplificación rápida de los extremos del ADNc (RACE)	Amplifica uno o ambos extremos (3' y 5') de ADNc utilizando una secuencia interna conocida y una cartilla arbitraria. Debido a la limitada información sobre las secuencias de ADN disponible para ese gen.	(Hébert, Basílico, Goldfarb, Haub, & Martin, 1990)
Transcriptasa reversa PCR (RT-PCR)	Amplificación de las especies de ARN mediante la implementación típica un sistema de dos enzimas. La primera enzima, la transcriptasa reversa copia el ARN para formar la cadena de ADNc seguido por la PCR con ADN polimerasa.	(Eldadah <i>et al.</i> , 1991)
Touchdown PCR	Comúnmente se utiliza para identificar secuencias de ADN con primers diseñados a partir de la secuencia de proteínas por tener codones alternativos. Al inicio de la PCR se programa con alta temperatura de alineación seguida de una disminución gradual para promover la amplificación específica del amplicón.	(Don, Cox, Wainwright, Baker, & Mattick, 1991)

Evolución de la taq polimerasa

En los comienzos de la PCR se utilizaba una ADN polimerasa que era inactivada con la temperatura de desnaturalización. Esto hacía que se tuviera que agregar nueva enzima a la mezcla de PCR en cada ciclo antes de la etapa de extensión. En 1988, se introdujo una ADN polimerasa termoestable para altas temperaturas (95 °C), aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (Taq) automatizando la especificidad, el rendimiento, la sensibilidad y la longitud de los amplicones en la PCR (Saiki *et al.*, 1988). La Taq polimerasa tenía una tasa de error (mutación por nt por ciclo) de 2×10^{-4} en la PCR, la cual era ineficiente para realizar PCR de alta fidelidad (Saiki *et al.*, 1988). En la búsqueda de una polimerasa termoestable y con alta fidelidad, en 1991 se propuso la primera ADN polimerasa termoestable con actividad exonucleasa de corrección de 3'-5', comúnmente conocida como la Vent™ polimerasa o Tli, la cual fué obtenida de *Thermococcus litoralis*, una especie de archaea que habita en los respiraderos térmicos en el océano profundo (Mattila *et al.*, 1991). La Vent™ ADN polimerasa posee alta fidelidad en la síntesis de ADN *in vitro* con una tasa de mutación en el rango de 30×10^{-6} siendo 4-5 veces más baja comparada con otras polimerasas, Esta característica brinda altas posibilidades para mantener la información genética intacta del ADN original en la PCR (Mattila *et al.*, 1991). En el mismo año, se propuso la ADN polimerasa Pfu proveniente de la archaeobacteria hipertermófila *Pyrococcus furiosus* (de Vries *et al.*, 2005), un organismo que vive en los respiraderos del océano profundo donde las temperaturas del hábitat son mayores de 100 ° C. A diferencia de la Taq polimerasa, la ADN polimerasa Pfu posee una actividad de exonucleasa de 3' a 5' que permite a la polimerasa corregir errores, consiguiendo una tasa de error de 1.6×10^{-6} , por esta característica los autores la propusieron como ideal para realizar técnicas que requieran síntesis de ADN de alta fidelidad, como la clonación directa de productos de amplificación por PCR, mutagénesis y amplificación para detectar mutaciones puntuales (Lundberg *et al.*, 1991). La elección de la polimerasa adecuada depende de la aplicación. A continuación, se muestra un resumen con descripción parcial de las diferentes ADN polimerasa más comunes, su tasa de mutación y la fuente que la propone (Tabla 3) (Terpe, 2013). Para mayor detalle sobre las ventajas y desventajas de cada una, consultar la revisión "Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems" (Terpe, 2013).

Las polimerasas de ADN termoestables tienen un rendimiento óptimo a temperaturas elevadas; sin embargo, a temperaturas bajas una cantidad significativa de enzima queda activada generando amplificaciones no deseadas. A través de los ciclos, estas amplificaciones reducen la eficiencia de la amplificación objetivo y el consumo de reactivos. Por este motivo, se han diseñado las *Hot-start* polimerasas que son un tipo de ADN polimerasa modificadas para permanecer inactivas hasta la primera etapa de desnaturalización. Los métodos más frecuentes para inactivar la enzima son: la inhibición de ligandos y la modificación química. La inhibición de ligando consiste en la unión específica de varios ligandos al sitio activo de la polimerasa, inhibiendo la actividad enzimática dependiente de la temperatura. Después de calentar a 95 ° C durante varios minutos, estos ligandos se disocian de la polimerasa y del sitio de unión al sustrato quedando disponible para la extensión del primer (Kuslich *et al.*, 2018). La modificación química consiste en realizar modificaciones químicas covalentes en aminoácidos específicos del sitio activo de la ADN polimerasa, el calentamiento de la mezcla a un pH bajo elimina la modificación de los aminoácidos y restaura la actividad de la enzima (Birch *et al.*, 1996). El método de PCR se ha optimizado con la creación de termocicladores y el perfeccionamiento de las polimerasas. Los termocicladores son instrumentos capaces de realizar distintos ciclos a temperaturas reguladas en cada ciclo de la reacción. Se han diseñado desde 1986 y actualmente, existe una gran gama de termocicladores altamente sofisticados y precisos, los cuales pueden ser reprogramados a las necesidades del usuario (Kuslich *et al.*, 2018). En el caso de las polimerasas, actualmente se comercializan diferentes tipos de ADN polimerasas para replicar el ADN, las más comunes son de tipo *Taq* y le siguen las de tipo *Pfu* y *Vent*. Las polimerasas se distinguen por tener cualidades particulares; por ejemplo: para realizar análisis mutacional, las *Pfu* polimerasas tienen mayor fidelidad que las *Taq* polimerasas, pero las *Pfu* suelen ser más costosas que las *Taq*. En el caso de las *Hot-start* polimerasas son típicamente más costosas que las demás debido a las modificaciones químicas que proveen beneficios como la reducción de contaminación, incremento en la especificidad y la reproducibilidad. Estas características de costo-beneficio deben tomarse en cuenta al realizar el presupuesto de un proyecto (Kuslich *et al.*, 2018)

Tabla 3. Lista de las ADN polimerasas más comunes, extraída y modificada de (Terpe, 2013).

Nombre de la ADN polimerasa	Especie de origen	Referencias
Deep Vent™	<i>Pyrococcus species GB-D</i>	(Cline <i>et al.</i> , 1996, Huang and Keohavong, 1996)
KOD1	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	(Takagi <i>et al.</i> , 1997)
Pab (Isis™)	<i>Pyrococcus abyssi</i>	(Dietrich <i>et al.</i> , 2002)
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>	(Kim <i>et al.</i> , 2007, Cline <i>et al.</i> , 1996)
Pwo	<i>Pwo Pyrococcus woesei</i>	(Dąbrowski and Kur, 1998)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>	(Eckert and Kunkel, 1990, Flaman <i>et al.</i> , 1994, Lee <i>et al.</i> , 2010)
Tbr (DyNAzyme™)	<i>Thermus brokianus</i>	No público
Tca	<i>Thermus caldophilus</i>	(Park <i>et al.</i> , 1993)
Tfi	<i>Thermus filiformis</i>	(Choi <i>et al.</i> , 1999, Zheng <i>et al.</i> , 2006)
Tfl	<i>Thermus flavus</i>	(Kaledin <i>et al.</i> , 1981)
Tfu	<i>Thermococcus fumiculans</i>	(Cambon-Bonavita <i>et al.</i> , 2000)
Tgo	<i>Thermococcus gorgonarius</i>	(Bonch-Osmolovskaya <i>et al.</i> ,1996)
Tli (Vent™)	<i>Thermococcus litoralis</i>	(Cline <i>et al.</i> , 1996, Mattila <i>et al.</i> , 1991)
Tma (UITma™)	<i>Thermotoga maritima</i>	(Diaz and Sabino, 1998, Flaman <i>et al.</i> , 1994)
TNA1_pol	<i>Thermococcus sp. NA1</i>	(Kim <i>et al.</i> , 2007)
Tne	<i>Thermotoga neopolitana</i>	(Chatterjee <i>et al.</i> , 2002)
Tpe	<i>Thermococcus peptonophilus</i>	(Lee <i>et al.</i> , 2010)
Tth	<i>Thermus thermophilus</i>	(Carballeira <i>et al.</i> , 1990)
Tzi (Pfx50™)	<i>Thermococcus zilligii</i>	(Griffiths <i>et al.</i> , 2007)

Electroforesis

La electroforesis es una técnica que se utiliza para purificar, determinar la presencia o ausencia, tamaño, estructura, cantidad y modificaciones de las proteínas y los ácidos nucleicos (Gallagher, 2014).

El fundamento de la electroforesis es el movimiento de una molécula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Por ejemplo, en el análisis de ácidos nucleicos, las moléculas están cargadas negativamente debido a sus esqueletos de fosfato. La muestra se coloca en el extremo del electrodo negativo del tanque de gel. Cuando se aplica energía, estas moléculas cargadas negativamente migrarán al electrodo positivo, permitiendo visualizar la presencia y cantidad de alguna secuencia de ADN o ARN

(Gallagher, 2014).

La técnica de electroforesis se utiliza para determinar la pureza y tamaño de la muestra, análisis genético para conocer las mutaciones en el ADN y la expresión génica en los niveles de ARNm y de proteína, también se utiliza para la detección de modificaciones postraduccionales en proteínas e identificación de anticuerpos contra organismos patógenos que indican infección. La electroforesis emplea el enfoque isoeléctrico en un gel. Se utilizan dos tipos de geles, el primero es el gel de acrilamida útil para fragmentos pequeños de ADN y para la mayoría de las proteínas. El segundo es el gel de agarosa formado de poros más grandes que permiten la separación de fragmentos más grandes de ADN utilizados comúnmente en las técnicas de biología molecular (Gallagher, 2014). Para analizar secuencias de ADN, los resultados de la PCR se analizan con electroforesis en gel de agarosa, se tiñe el ADN y se visualiza (Kuslich *et al.*, 2018), después se purifica y se secuencía para determinar si hay alguna mutación o polimorfismo en la secuencia de ADN (Gallagher, 2014).

Preparación del gel de agarosa y visualización de las moléculas

Los geles de agarosa se preparan calentando el amortiguador de electroforesis para disolver la agarosa. Una vez que la agarosa está fundida se tiñe con reactivos, por ejemplo: SYPRO Orange o SYPRO Red para proteínas, SYBR Green o bromuro de etidio para ADN, se vierte en una bandeja de gel para solidificar y formar el gel rectangular con pequeñas cavidades donde se cargará la muestra de ADN o ARN (Gallagher, 2014). Cuando el gel está cargado con la muestra se coloca en la cámara de electroforesis para que la muestra migre en dirección al polo opuesto de su carga. Las moléculas con menor peso molecular avanzan más rápido que las de mayor peso molecular. Finalmente, el gel se expone en luz ultravioleta en un transiluminador para producir una excitación y se visualizan las bandas por la fluorescencia emitida (Gallagher, 2014).

Secuenciación

La secuenciación es el proceso que determina la secuencia nucleotídica o de péptidos. Desde un fragmento de secuencia hasta un genoma completo. Conocer la secuencia de las bases provee información para identificar mutaciones, alelos, entre otras aplicaciones etc. Actualmente existen siete enfoques para realizar este proceso: a) secuenciación

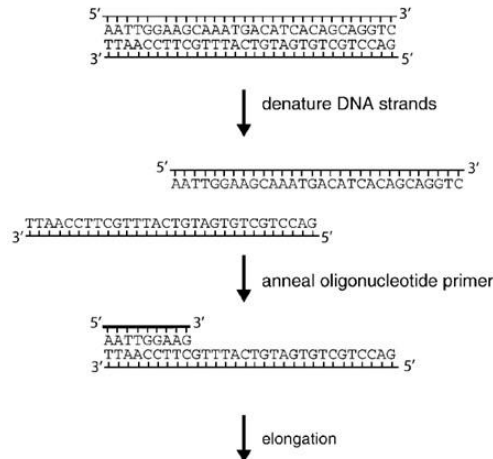
dideoxi; b) secuenciación por base sólida; c) secuenciación por hibridación, d) espectrometría de masas; e) secuenciación por arreglos cíclicos; f) microelectroforesis y g) secuenciación por nanoporos (Shendure *et al.*, 2011). Cuando la muestra presenta la pureza y concentración ideales, hoy en día se logran lecturas exitosas de hasta 800 pb, aún con esta tasa de éxito la secuenciación automatizada está en constante mejora para hacer el proceso más eficiente (Touchman, 2009).

Secuenciación Sanger

La secuenciación Sanger es un método de secuenciación que utiliza el enfoque de cadena de terminación mediada por dideoxirribonucleósido (ddNTP), esta ha sido la tecnología dominante desde 1977 (Sanger *et al.*, 1977, Shendure *et al.*, 2011). La secuenciación Sanger consiste en desnaturalizar la cadena de ADN con calor generando dos cadenas sencillas. La hebra complementaria de dirección 3'-5' es reconocida por el *primer* complementario a la secuencia. Se añade ADN polimerasa a la reacción y la mezcla se separa para generar 4 reacciones. En cada reacción se agregan los desoxinucleótidos trifosfatos dNTPs que son moléculas compuestas de base nitrogenada (A, C, G o T), azúcar y fosfato. También se agregan pequeñas cantidades de dideoxirribonucleósidos trifosfatos (ddNTP) son moléculas marcadas con fluorocromos y modificadas con un -H en vez de un -OH en el carbono 3 de la ribosa. Cuando esta molécula se incorpora a la extensión de la cadena de ADN su modificación evita la formación del enlace fosfodiéster interrumpiendo la elongación de la cadena y generando fragmentos amplificados con el ddNTP terminal marcado. Esta reacción se repite varias veces generando amplicones de diferente tamaño y con diferente base terminal de ddNTP. Para identificar el orden de la secuencia, los amplicones que difieren en tamaño de un solo nucleótido se separan por electroforesis de alta resolución. La electroforesis consiste en cargar la mezcla por inyección electrocinética en un tubo capilar de vidrio lleno de gel. Después se aplica una corriente eléctrica más potente al capilar para extraer los productos de reacción separando por tamaño los fragmentos. Los fragmentos son discernibles a medida que el tubo capilar pasa por una ventana de detección, donde se enfoca la luz láser. La luz láser excita la molécula fluorescente contenida en el ddNTP terminal de cada fragmento emitiendo una longitud de onda específica para A, C, G o T. La emisión de luz de los tintes fluorescentes es detectada por un instrumento de secuenciación automatizada y enviado a una computadora que construye el orden de los nucleótidos en base a los fragmentos que pasan por el detector, el orden de los nucleótidos es visualizado por el usuario en un electroferograma (Figura 13)

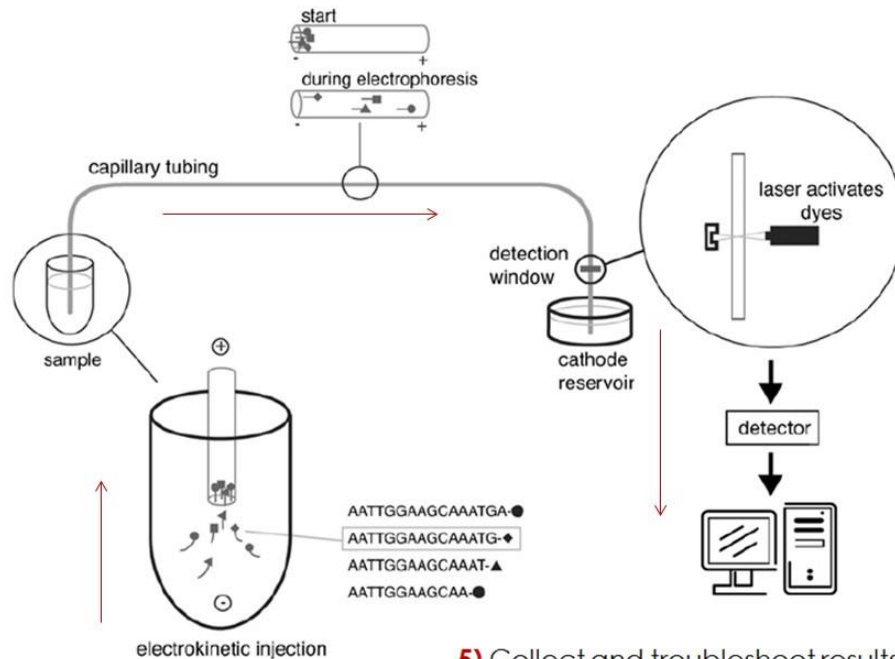
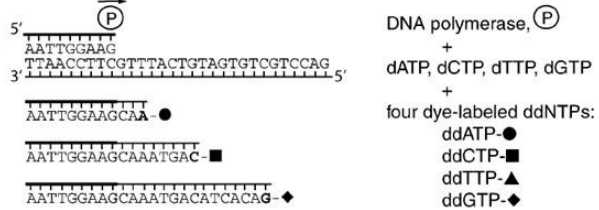
(Touchman, 2009).

1) Purify template DNA to be sequenced.



2) Design oligonucleotide primers specific to your template.

3) Perform four-color fluorescent DNA sequencing reactions (service provider).



5) Collect and troubleshoot results.

4) Conduct fragment analysis on a sequencing instrument (service provider).

Figura 13. Secuenciación de ADN de Sanger, (extraída de (Touchman, 2009).

Electroferograma

El electroferograma es la imagen digital que arroja el secuenciador por cada nucleótido detectado en el gel. El conjunto de imágenes obtenidas de la secuenciación de un fragmento son documentadas en un archivo para su posteriormente análisis mediante programas computacionales, en este estudio se utilizó el programa Finch TV (Moomaw *et al.*, 2014).

Interpretación de un electroferograma

La calidad del electroferograma depende de la resolución, a resoluciones más altas más bandas son detectables. Cuando el pico es grande en el electroferograma significa que el nucleótido detectado tuvo alta resolución. El programa Finch TV coloca barras grises encima de cada nucleótido para indicar alta o baja resolución, esto facilita la interpretación en el análisis manual (Moomaw *et al.*, 2014). Una buena secuenciación se distingue por la distorsión de los picos en las primeras 15 bases aproximadamente, seguido de picos bien definidos en el resto de la secuencia. Al término, los picos se ensanchan y su calidad disminuye progresivamente (Figura 14).

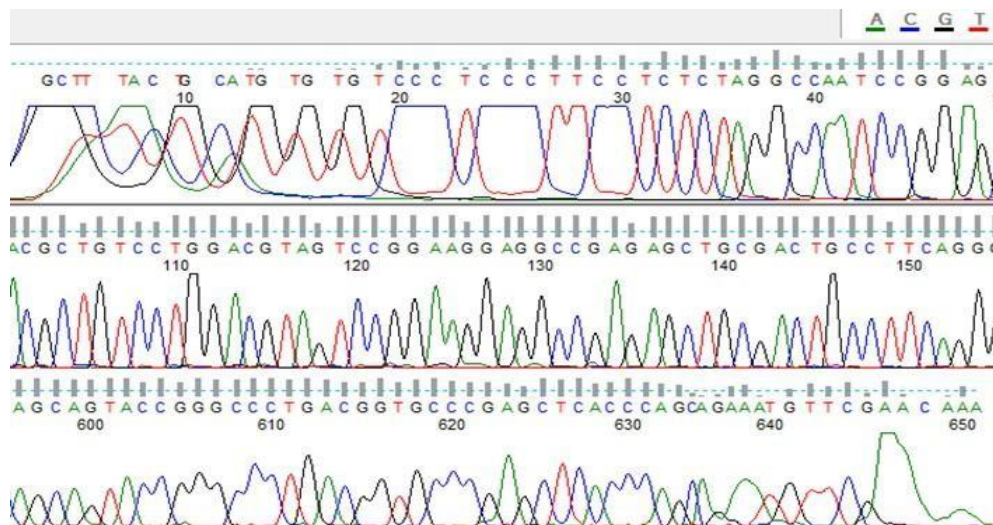


Figura 14. Ejemplo de electroferograma visualizado en el programa computacional Finch TV.

Recolección de muestra

La muestra de ADN se recolectó de la saliva del paciente con un Oragene DNA (OG.500) por el Dr. Victor Hugo Hernández.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se obtuvo de la muestra por el departamento de Servicios Genómicos – UGA Langebio Cinvestav. El ADN purificado se re suspendió en amortiguador TE 1X (10Mm Tris pH=8.0 /1Mm EDTA).

Cuantificación de la muestra

La concentración de ADN se cuantificó por dos métodos:

I. Cuantificación por espectrometría:

Volumen = 210 μ L concentración = 17.1 ng/ μ L

II. Cuantificación por fluorometría

Volumen = 210 μ L concentración = 7.4 μ g.

Método para el diseño de *primers* específicos

Primer-BLAST, es una herramienta de libre acceso desarrollada por El Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) para crear *primers* específicos a la plantilla de interés (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Utiliza el software *Primer 3* para diseñar los *primers*, después realiza una alineación global con BLAST para evitar amplificaciones no deseadas (Ye *et al.*, 2012). El diseño de los *primers* se realizó con las siguientes características: I) Longitud ideal entre 20-25 nucleótidos, II) La temperatura de fusión del par de *primers* de 50-65 °C (Hersheson *et al.*, 2013), III) El contenido GC en un 40-60%, IV) La auto-complementariedad debe ser evitada para minimizar la formación de estructuras secundarias y los dímeros de primer, V) Debe tener un 100% de apareamiento con el molde, VI) El tamaño máximo de las secuencias a amplificar fue de 800 pb ya que así lo sugirió el laboratorio de Servicios Genómicos del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), para asegurar la calidad de los resultados.

Los *primers* se diseñaron en Primer-BLAST, se añadió la secuencia parcial del gen TUBB4A en formato FASTA del primer y segundo exón como plantilla de la PCR para generar el par de *primers* del amplicón 1. Después se añadió la secuencia parcial que incluye el tercer y cuarto exón para generar el par de *primers* del amplicón 2. Finalmente, la secuencia del exón 5 se dividió por mitad ya que el tamaño excede las 800 pb. Aquí se ingresó la primera parte del exón 5 para generar el par de *primers* de amplicón 4 y después la segunda parte del exón 5 para generar el par de *primers* del amplicón 5. El tamaño de los *primers* se delimitó a un rango de longitud de 19-22pb. Los *primers* se diseñaron a una distancia de al menos 10 pb anterior a la secuencia de interés, debido a que en la secuenciación por Sanger genera mala calidad en las primeras bases. Cabe resaltar que el primer Reverse 3' > 5' de la primera mitad del exón 5 y el primer Forward 5' > 3' de la segunda mitad del exón 5 se diseñaron para que traslapen en aprox. 10 pb. De esta forma se buscó incrementar la calidad de secuenciación en todos los exones.

Evaluación de los primers específicos

Una vez diseñados los *primers* en Primer-BLAST, se realizó un análisis para confirmar su especificidad y verificar que ningún par de *primers* fuera complementario para amplificar alguna secuencia no deseada en el resto del genoma humano. BLAST- nucleotide es una herramienta de libre acceso para la alineación local. El análisis de especificidad se realizó alineando cada *primer* por separado en BLAST-nucleotide con el genoma humano (Homo sapiens GRCh38.p12 [GCF_000001405.38]). Los *primers* fueron diseñados en dirección de 5'-3', el extremo 3' es donde se inicia la replicación. Si las condiciones fueran óptimas y el extremo 3' de algún *primer* se alinea en una región del genoma formando apareamiento con otro *primer*, esta región no deseada puede llegar amplificarse. Para evitar la amplificación en regiones no deseadas, se evaluaron los sitios de coincidencia de los *primers* diseñados con el genoma, verificando que los traslapes en la región 3' no fuesen complementarios con otro *primer*. De tal modo, al realizar la alineación con BLAST-nucleotide se eligieron las coincidencias representadas al límite izquierdo o derecho de la alineación, que es donde traslapa la región 3' (Figura 15).

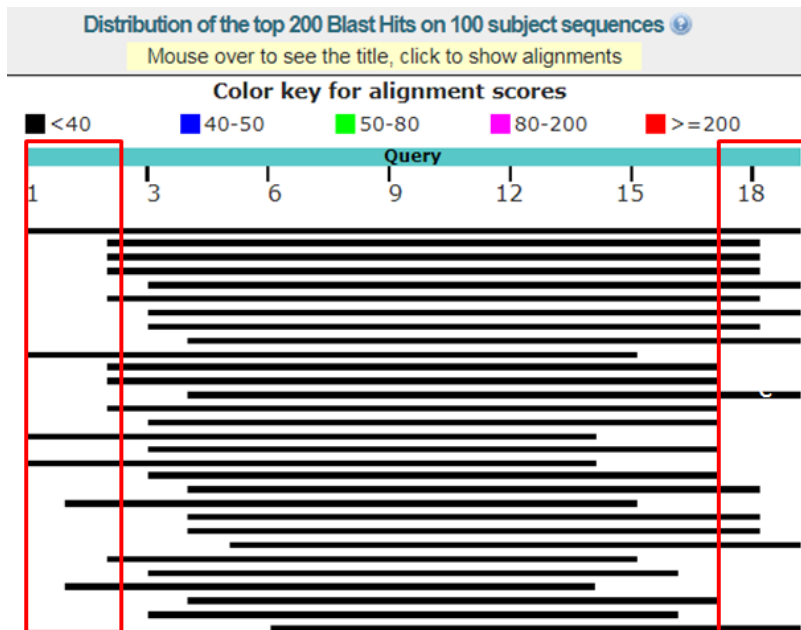


Figura 15. Ejemplo de alineación con BLAST-nucleotide del *primer* Revers 3'->5' del amplicón 1 con el genoma humano, los rectángulos rojos señalan las regiones de traslape del extremo 3' del *primer* con el resto los cromosomas.

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_568815594

Una vez identificados los cromosomas con los que se alineó el *primer*, se eligieron las coincidencias hasta con un mínimo de 13 pb (Figura 16).

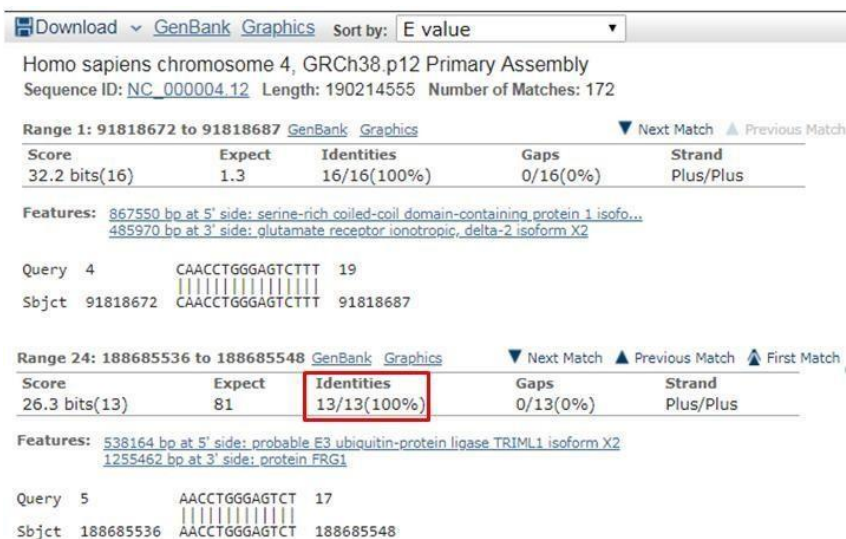


Figura 16. Ejemplo del *primer* alineado con el cromosoma 4 del genoma humano, se tomaron las secuencias con coincidencias mayores a 13 pb, marcado en el rectángulo rojo. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_568815594

MUSCLE es un software de libre acceso para alineación de secuencias múltiples <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>. Este software se utilizó para alinear la lista de las coincidencias obtenidas en BLAST-nucleotide de cada cromosoma con los *primers*, la lista se introdujo en MUSCLE para realizar la alineación múltiple para cada cromosoma, evidenciando el posible traslape en la región 3' (Figura 17). Una vez confirmado, se consideró la dirección del primer y se analizó manualmente que no fuera funcional para formar par con algún otro *primer* que pudiera traslapar cerca de la región, ya que podría amplificar si estuviera en dirección complementaria.

MUSCLE

Input form | Web services | Help & Documentation | Bioinformatics Tools FAQ

Tools > Multiple Sequence Alignment > MUSCLE

Results for job muscle-I20190420-214400-0510-17008484-p1m

Alignments | Result Summary | Phylogenetic Tree | Submission Details

Download Alignment File | View result with Jalview | Send to Simple Phylogeny | Send to MView

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

```

13cr4      --GAACATCTGTTGGGTGAG
14cr4      -----ATCTGCTGGGTGAG
16cr4      -----ATCTGCTGGGTGAG
Cebador    TCGAACATCTGCTGGGTGAG
19cr4      -----CATCTGCTGGGTGA-
18cr4      -----CATCTGCTGGGTGA-
17cr4      -----CATCTGCTGGGTGA-
15cr4      -----CATCTGCTGGGTGA-
          *****

```

Figura 17. Ejemplo de alineación múltiple en MUSCLE con la lista de coincidencias de un primer con el cromosoma 4. La complementariedad del extremo 3' se identifica cuando la secuencia es alineada en el extremo 3' del *primer*, señalado con el rectángulo rojo.

<https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=muscle-I20190420-214744-0589-49152503-p1m>

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Alícuotas de ADN

La muestra de ADN genómico purificado del paciente tuvo un volumen total de 210 μ L.

Este volumen se dividió en cuatro alícuotas con un volumen de 52 μL cada una en un tubo de 1.5 mL. Tres de las alícuotas se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la cuarta se almacenó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para trabajar con ella. Se tomó la concentración de 17.1ng obtenida por cuantificación de espectrometría.

Dilución de primers

Los primers se recibieron liofilizados del proveedor con una cantidad de: amplicón 1 (*P. Forward* 24.3 nmol y *P. Revers* 24.27 nmol), amplicón 2 (*P. Forward* 24 nmol y *P. Revers* 24.36 nmol), amplicón 3A (*P. Forward* 22.24 nmol y *P. Revers* 24.56 nmol), amplicón 3B (*P. Forward* 24.74 nmol y *P. Revers* 22.54 nmol) se agregó la cantidad de cada primer por 10 en volumen de agua (μL) para obtener una solución a $100\text{ }\mu\text{M}$. Utilizando la fórmula $C_1V_1=C_2V_2$, se tomó volumen de cada primer para obtener la solución madre a concentración final de $88.36\text{ }\mu\text{M}$ (Tabla 4).

Obteniendo la solución madre de todos los primers a la misma concentración ($88.36\text{ }\mu\text{M}$) se tomaron $5.65\text{ }\mu\text{L}$ de la solución madre y se disolvieron en $50\text{ }\mu\text{L}$ de agua formando "la solución trabajo" a una **concentración** de $10\text{ }\mu\text{M}$. Después se tomaron $0.4\text{ }\mu\text{L}$ de "la solución trabajo" y se disolvieron en $20\text{ }\mu\text{L}$ de agua formando "la solución para PCR" a una concentración de $0.2\text{ }\mu\text{M}$, de esta solución final es donde se extrajo el volumen para realizar las PCR.

Tabla 4. Dilución de primers para obtener solución madre

Amplicón 1 <i>P. Forward</i> ($100\text{ }\mu\text{M}$) ($243\mu\text{L}$) = ($88.36\text{ }\mu\text{M}$) (x) = $275\mu\text{L}$	Amplicón 1 <i>P. Reverse</i> ($100\text{ }\mu\text{M}$) ($247.6\mu\text{L}$) = ($88.36\text{ }\mu\text{M}$) (x) = $280.21\mu\text{L}$
Amplicón 2 <i>P. Forward</i> ($100\text{ }\mu\text{M}$) ($240\mu\text{L}$) = ($88.36\text{ }\mu\text{M}$) (x) = $271.61\text{ }\mu\text{L}$	Amplicón 2 <i>P. Reverse</i> ($100\text{ }\mu\text{M}$) ($243.6\text{ }\mu\text{L}$) = ($88.36\text{ }\mu\text{M}$) (x) = $275.69\text{ }\mu\text{L}$
Amplicón 3A <i>P. Forward</i> ($100\text{ }\mu\text{M}$) ($232.4\text{ }\mu\text{L}$) = ($88.36\text{ }\mu\text{M}$) (x) = $263.01\mu\text{L}$	Amplicón 3A <i>P. Reverse</i> ($100\text{ }\mu\text{M}$) ($245.6\text{ }\mu\text{L}$) = ($88.36\text{ }\mu\text{M}$) (x) = $277.95\text{ }\mu\text{L}$
Amplicón 3B <i>P. Forward</i> ($100\text{ }\mu\text{M}$) ($247.4\text{ }\mu\text{L}$) = ($88.36\text{ }\mu\text{M}$) (x) = $279.9\text{ }\mu\text{L}$	Amplicón 3B <i>P. Reverse</i> ($100\text{ }\mu\text{M}$) ($225.4\text{ }\mu\text{L}$) = ($88.36\text{ }\mu\text{M}$) (x) = $255.09\text{ }\mu\text{L}$

Métodos para la optimización de la amplificación por PCR

Para estandarizar el protocolo de la PCR se realizaron pruebas con volumen de 20 µL, procedimiento identificable como PCR analítico. Cuando las condiciones fueron óptimas se realizaron PCRs con mayor volumen de reacción en un rango de 50 µL, 100 µL ó 150 µL. Reacción identificable como PCR preparativa. Las pruebas de PCRs analíticas y preparativas se encuentran resumidas en la Tabla 5.

Tabla 5. Resumen de las PCRs

PCR	ADN polimerasa	Potenciadores	Volumen	TA	Amplif.			Secuenc.	Calidad	Fidelidad	Mutación	Mutación 3
Analítica y preparativa					1	2	3A	3B				
Ensayo 1	Taq Platinum		20 µl	60 °C	X	✓	✓	✓				
Ensayo 2	Hot Start Taq Master Mix		20 µl	60 °C	✓	∅	∅	∅				
Ensayo 2	Taq Polimerase PR 100 Acurris		20 µl	60 °C	X	∅	∅	∅				
Prep. 1	Taq Platinum		150 µl	60 °C	∅	✓	X	✓	✓	alta	alta	no hay m. incertidumb
Prep. 1	Hot Start Taq Master Mix		60 µl	60 °C	✓	∅	∅	∅	✓	baja		
Disminución en la temperatura de alineación												
Ensayo 3	Taq Platinum		100 µl	56 °C	✓	∅	∅	∅	✓	baja		
Ensayo 3	Hot Start Taq Master Mix		20 µl	56 °C	✓	∅	∅	∅	✓	baja		
Ensayo 3	Taq Polimerase PR 100 Acurris		50 µl	56 °C	✓	∅	∅	∅	✓	baja		
Prep. 2	Taq Platinum		100 µl	56 °C	X	∅	∅	∅				
Prep. 2	Taq Platinum		100 µl	56 °C	∅	∅	X	∅				
Prep. 2	Taq Polymerase PR 100 Acurris		50 µl	56 °C	∅	∅	✓	∅	✓	alta	baja	
Prep. 2	Taq Platinum		100 µl	56 °C	∅	∅	∅	X				
Prep. 3	Taq Polymerase PR 100 Acurris		50 µl	56 °C	∅	∅	X	∅				
Prep. 3	Taq Polymerase PR 100 Acurris		50 µl	56 °C	∅	∅	∅	✓	✓	alta	baja	
Optimización de la PCR con agentes desnaturizantes												
Ensayo 4	Taq Platinum	DMSO 5% BSA 10µ	21.2 µl	56 °C	X	∅	X	X				
Ensayo 4	Taq Platinum	DMSO 2% BSA 5µ	20.15 µl	56 °C	X	∅	X	✓				
Ensayo 4	Taq Platinum	DMSO 7%	20.7 µl	56 °C	X	∅	X	∅				
Ensayo 4	Taq Platinum	DMSO 2%	20 µl	56 °C	X	∅	✓	∅				
Ensayo 4	Taq Platinum	DMSO (control) sin	20 µl	56 °C	X	∅	X	X				
Prep. 4	Taq Platinum	DMSO 2%	50 µl	56 °C	X	∅	✓	✓	✓	alta	alta	si hay no hay mut
Prep. 5	Taq Platinum	DMSO 2%	100 µl	56 °C	∅	∅	✓	∅	✓	alta	alta	si hay
Ensayo 5	Taq Platinum	ADN plasmídico	20.45 µl	56 °C	∅	∅	∅	∅				
Ensayo 5	Taq Platinum	Se añade: 5.46 µl	26 µl	56 °C	X	∅	∅	∅				
Ensayo 5	Taq Platinum	BSA	20 µL	56 °C	X	∅	∅	∅				
Ensayo 5	Hot Start TaqMaste	BSA	20 µL	56 °C	✓	∅	∅	∅	✓	media-alt	alta	no hay m. mta.
Ensayo 5	Hot Start TaqMaste	DMSO	20 µL	56 °C	✓	∅	∅	∅	✓	media-alt	alta	no hay m. mta.

Ensayo 1: verificación de primers

La primera prueba se realizó para verificar que los primers diseñados amplificaran las secuencias esperadas.

Se prepararon 8 tubos para PCR, de los cuales 4 fueron control y 4 fueron de los amplicones. Cada tubo contenía 0.5 µL de ADN genómico, 0.4 µL de primer Forward y 0.4 µL de primer Reverse, 18 µL de Mix Taq Platinum y se agregó 0.7 µL de agua para adquirir un volumen total de 20 µL. El par de primers que se agregó fue específico para cada amplicón y los tubos control para cada amplicón se le agregó también el par de primers, Mix Taq Platinum, agua y sin ADN. La PCR se corrió a 30 ciclos (30X) (Figura 18).

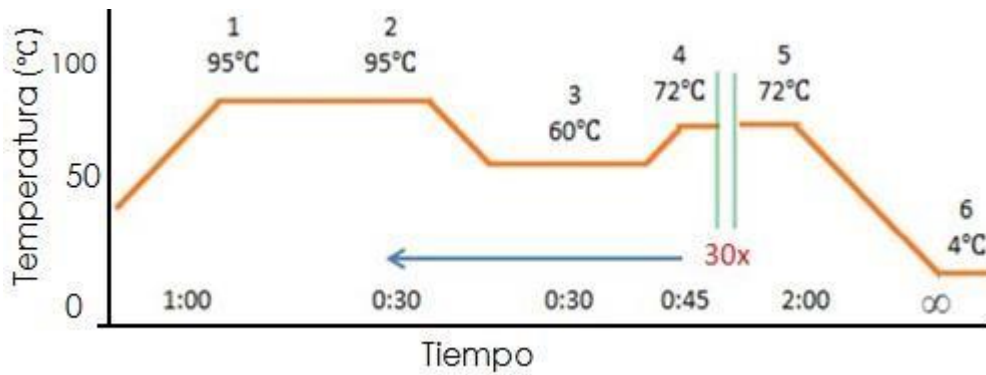


Figura 18. Diagrama de las etapas de PCR, condiciones implementadas en el ensayo 1.

Optimización de la PCR con amplificación de alta fidelidad

Para optimizar la fidelidad de las secuencias de ADN amplificadas, se probaron diferentes enzimas. Las ADN polimerasas utilizadas en este estudio son de tipo Taq y con modificaciones para inactivación, es decir, "Hot-start". Dos de las polimerasas se encontraban en un tubo con presentación *Master Mix* (*Platinum Hot Start Master Mix* de ThermoFisher y *Accuris PR1001-HS-S Hot Start Taq Master Mix*) y la tercera polimerasa estaba en un tubo independiente del resto de los compuestos (*Taq polymerase PR 1000 Accuris™*).

Ensayo 2: Concentración ideal de ADN para el amplicón 1 con Taq Hot Start

Esta prueba se realizó para probar la *Taq Hot Start* en el amplicón 1. Se prepararon 3 tubos variando la concentración de ADN con 0.5 μ L, 1 μ L y 3 μ L, después a cada uno se agregó 0.8 μ L de *primer Forward*, 0.8 μ L de *primer Reverse*, 10 μ L de *Taq Hot Start* y se completó con agua hasta obtener un volumen total de 20 μ L. También se incluyó otro tubo con *Master Mix Platinum* con *primers* para el amplicón 1 solo para confirmar que esta Taq no funciona. La PCR se corrió a 32 ciclos (32X) (Figura 19).

Preparativa 1

Se realizó una PCR preparativa con volumen de 150 μ L para cada reacción de los amplicones 2, 3A y 3B, se implementaron los parámetros del Ensayo 1. En el amplicón 1 se realizó una reacción con volumen de 150 μ L implementaron los parámetros del Ensayo 2.

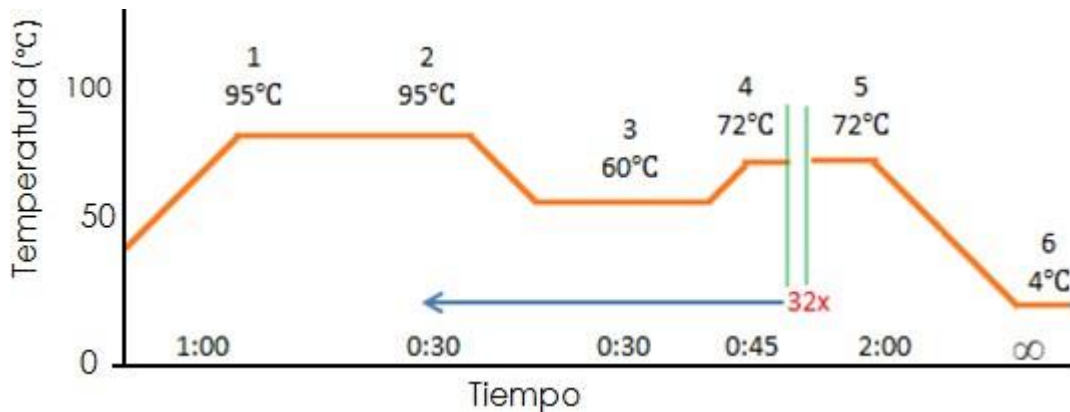


Figura 19. Diagrama de las etapas de PCR, condiciones implementadas ensayo 2 y preparativa 2.

Optimización de amplificación a diferentes temperaturas de apareamiento

Ensayo 3: Disminución de la temperatura de alineación

Para encontrar las condiciones ideales de amplificación se disminuyó la temperatura de alineación a (TA) 4°C por debajo de la temperatura de fusión (Hersheson *et al.*, 2013) de los primers, modificando de 60°C a 56°C para TA.

Se realizaron pruebas para el amplicón 1 con diferentes Taq Polimerasa. El primer tubo de 20 µL contenía Taq Hot Start, el segundo tubo de 50 µL contenía Taq polymerase PR 1000 Accuris, y el tercer tubo de 100 µL contenía Taq Platinum. Se corrieron a 32 ciclos (32X) (Figura 20).

Preparativa 2

Para el amplicón 1 se preparó un tubo de 100 µL con Taq Platinum como en el ensayo 3, para el amplicón 3A se prepararon 2 tubos, el primero de 100 µL con Taq Platinum y el segundo de 50 µL con Taq polymerase PR 1000 Accuris. Finalmente, para el amplicón 3B se preparó un tubo con volumen de 100 µL para Taq Platinum.

Preparativa 3

La preparativa 2 amplificó la Taq polymerase PR 1000 Accuris en 3A. Se realizó el mismo procedimiento de la preparativa 2 para amplificar los amplicones 3A y 3B con Taq polymerase PR 1000 Accuris en volumen de 50 µL.

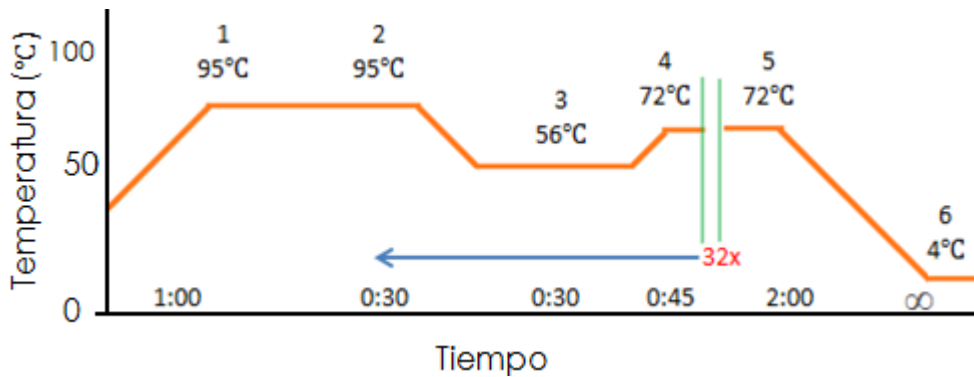


Figura 20. Diagrama de las etapas de PCR, condiciones de tiempo y temperatura estandarizadas para las PCRs.

Optimización de amplificación por agentes desnaturalizantes (DMSO y BSA)

Ensayo 4: Pruebas con potenciadores

Las regiones ricas en **G/C** disminuyen el rendimiento de la PCR, existen agentes y aditivos que mejoran la reacción logrando amplificar apropiadamente (Frackman *et al.*, 1998). El DMSO es un agente comúnmente utilizado para mejorar la reacción y, la albúmina de suero bovino (BSA) es un co-potenciador del DMSO. Cuando se agregan ambos reactivos a una mezcla se ha observado que incrementa el potencial de la reacción (Farell and Alexandre, 2012). De acuerdo con esta información se probaron diferentes concentraciones de DMSO con BSA puesto que el amplicón 1 y 3A son regiones ricas en G/C. Todos los ensayos se corrieron a 32 ciclos (32X).

Ensayo 4.1 DMSO 5% y BSA 10 µg/ µL:

Se preparó un mix que contenía: Platinum 54 µL, ADN 1.5 µL, DMSO 3 µL y BSA 2.7 µL, obteniendo un volumen de 61.2 µL. Este volumen se dividió en tres partes iguales a 20.4 µL y se agregó 0.4 µL de *P. Forward* y 0.4 µL de *P. Reverse* a cada tubo correspondiente al amplicón 1, 3A y 3B. Adquiriendo un volumen final de 21.2 µL en cada muestra.

Ensayo 4.2 DMSO 2% y BSA 5 µg/ µL:

Se preparó un mix que contenía: Platinum 54 µL, ADN 1.5 µL, DMSO 1.2 µL y BSA 1.36 µL, obteniendo un volumen de 58.06 µL. Este volumen se dividió en tres partes iguales a 19.35 µL y se agregó 0.4 µL de *P. Forward* y 0.4 µL de *P. Reverse* a cada tubo correspondiente al amplicón 1, 3A y 3B. Adquiriendo un volumen final de 20.15 µL en cada muestra.

Ensayo 4.3 DMSO 7%:

Se preparó un mix que contenía: Platinum 36 μL , ADN 1 μL y DMSO 2.8 μL obteniendo un volumen de 39.8 μL . Este volumen se dividió en dos partes iguales a 19.9 μL y se agregó 0.4 μL de *P. Forward* y 0.4 μL de *P. Reverse* a cada tubo correspondiente al amplicón 1 y 3A. Adquiriendo un volumen final de 20.7 μL en cada muestra.

Ensayo 4.4 DMSO 2%:

Se preparó un mix que contenía: Platinum 36 μL , ADN 1 μL , DMSO 0.8 μL y Agua 0.6 μL obteniendo un volumen de 37.8 μL . Este volumen se dividió en dos partes iguales a 19.2 μL y se agregó 0.4 μL de *P. Forward* y 0.4 μL de *P. Reverse* a cada tubo correspondiente al amplicón 1 y 3A. Adquiriendo un volumen final de 20 μL en cada muestra.

Ensayo 4.5 (control):

Se preparó un mix que contenía: 54 μL , ADN 1.5 μL , DMSO 0.8 μL y Agua 2.1 μL obteniendo un volumen de 57.6 μL . Este volumen se dividió en tres partes iguales a 19.2 μL y se agregó 0.4 μL de *P. Forward* y 0.4 μL de *P. Reverse* a cada tubo correspondiente al amplicón 1, 3A y 3B. Adquiriendo un volumen final de 20 μL en cada muestra.

Preparativa 4:

De acuerdo con los resultados obtenidos de la amplificación del amplicón 3A con DMSO 2% y *Taq Platinum* del ensayo 4.4 de esta sección. Se realizó una PCR preparativa con volumen de 50 μL para los amplicones 3A, 3B y 1 esperando que amplifique con un volumen mayor que en el Ensayo 4.4 de métodos.

Preparativa 5:

Se realizó la repetición de la preparativa 4 para el amplicón 3A con un volumen de 100 μL .

Ensayo 5:

Este ensayo consistió en realizar varias pruebas para amplificar el amplicón 1, incluyendo una prueba para conocer la fluorescencia de BSA en el gel de agarosa, sin amplificar (Ensayo 5.2). Todos los ensayos se corrieron a 32 ciclos (32X).

Ensayo 5.1:

Se preparó un mix que contenía: Platinum 18 μL , ADN 0.6 μL , Mg 5.46 μL , *P. Forward* 0.52 μL y *P. Reverse* 0.52 μL de amplicón 1 y H₂O 0.9 μL , obteniendo un volumen de 26 μL .

Ensayo 5.2:

En el ensayo 4.1 y 4.2 el gel mostró una banda amplificada, pero se quedó en el pozo y no migró. Esta prueba se realizó para conocer si la fluorescencia es debido a la BSA aún sin amplificar o que la banda observada se debía a la amplificación esperada. Se preparó un mix que contenía: ADN plasmídico 0.5 μL , BSA 0.45 μL y H₂O 19.05 μL , obteniendo un volumen de 20.45 μL .

Ensayo 5.3:

Esta prueba se realizó para probar la eficiencia BSA como potenciador. Se preparó un mix que contenía: BSA 0.45 μL , *Platinum PCR Super Mix* 18 μL , ADN 0.5 μL , *P. Forward* 0.4 μL y *P. Reverse* 0.4 μL y H₂O 0.25 μL , obteniendo un volumen de 20 μL .

Ensayo 5.4:

Esta prueba se realizó para probar la eficiencia BSA como potenciador, pero con Taq diferente al ensayo 5.3. Se preparó un mix que contenía: *Hot Start Taq Master Mix* 10 μL , ADN 0.5 μL , *P. Forward* 0.8 μL y *P. Reverse* 0.8 μL , BSA 0.45 μL y H₂O 7.45 μL , obteniendo un volumen de 20 μL .

Ensayo 5.5:

Esta prueba se realizó para probar la eficiencia de DMSO como potenciador con *Hot Start Taq Master Mix*. Se preparó un mix que contenía: *Hot Start Taq Master Mix* 10 μL , ADN 0.5 μL , *P. Forward* 0.8 μL , *P. Reverse* 0.8 μL , DMSO 0.40 μL y H₂O 7.45 μL , obteniendo un volumen de 20 μL .

Gel de agarosa

Se utilizó gel de agarosa 1% para todas las electroforesis y se agregó *SYBR Green* como colorante para ADN. La proporción fue de 1/10,000 es decir, para 50 mL de gel de

agarosa se utilizó 5 μ L de colorante, así lo sugiere el manual. En las muestras de PCR se utilizó azul de bromofenol en proporción de 3 μ L por 20 μ L de muestra como marcaje para visualizar las muestras durante la electroforesis.

Adquisición de bandas amplificadas del gel de agarosa y purificación de los fragmentos amplificados

Con el objetivo de extraer las bandas amplificadas, se visualizó el gel de agarosa en el transiluminador. Una vez identificadas las bandas, se cortó una a la vez con la navaja y se colocó en un tubo de 2 mL previamente nombrado con el número de amplicón correspondiente. Para evitar contaminaciones cruzadas de los amplicones, se cambió la navaja a cada banda extraída del gel.

Los fragmentos de gel fueron purificados con el kit de extracción de gel *QIAquick* de *QIAGEN*. Obteniendo muestras de ADN diluidas en agua por requisito de servicios genómicos de *LANGEBIO* para su posterior secuenciación. La metodología adoptada fue la siguiente:

Se pesó el fragmento de gel contenido en el tubo de 2 mL en la balanza analítica. El peso del gel no debe ser mayor a 200 mg en cada tubo, puesto que se le agregará un total de 5 veces su peso volumen. Se agregó 3 veces su peso en volumen con Buffer QG, tomando la equivalencia de 100mg ~ 100mL. El tubo de 2 mL se incubó a 50 °C por 10 min agitándolo cada 3 min para permitir que se disolviera la agarosa y crear una mezcla uniforme. Una vez disuelta la agarosa adquirió un color verdoso, lo que indicó un pH ideal. Después se agregó su peso en volumen de isopropanol a la mezcla y se tomaron 800 μ L del tubo de la mezcla para pasarlos a la columna de centrifugado. La columna se centrifugó x 1 min a 13,000 g. La mezcla centrifugada se desecha y se repite este paso colocando el restante que quedó del tubo de 2 mL a la columna para centrifugar nuevamente. Se agregó 500 μ L de Buffer QG a la columna, se centrifugó x 1 min a 13,000 g y se desechó el restante. Para el lavado, se agregó 750 μ L de Buffer PE. Después de 5 min de reposo se centrifugó y se desechó el residuo. Se colocó la columna dentro de un tubo de 1.5 mL y se agregó 50 μ L de agua estéril. Después de 4 min de reposo se centrifugó por 1 min y se almacenó el residuo en un tubo a 4 °C.

Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN se realizó en el espectrofotómetro *Take3 Micro-Volume Plate* de *BioTek Instruments*. Se tomaron 2 μL de cada muestra previamente purificada y se colocaron en el espectrofotómetro, tratando cada vez de incluir una o dos réplicas de la misma muestra.

Finch TV

Finch TV es un software de libre acceso creado por Geospiza. Inc. Los cromatogramas son el tipo de archivo que contiene los resultados de secuenciación Sanger. La secuenciación de las muestras se realizó en el departamento de Servicios Genómicos – UGA Langebio Cinvestav. Los resultados fueron recibidos en electroferogramas sin edición y visualizados en el software *Finch TV* para así poder interpretarlos (<https://www.geospiza.com/finchtv>).

Resultados

Primers específicos diseñados para el gen TUBB4A

Se obtuvieron 4 pares de *primers* específicos para el gen TUBB4A. La longitud de los exones en el gen TUBB4A: es de 33 pb para el exón 1 y de 217 pb para el exón 2, entre ellos se localiza una secuencia intrónica. El primer par de *primers* se diseñó para amplificar ambos exones y la región intrónica generando un amplicón de 690 pb (amplicón 1). Esta estrategia también se implementó para el exón 3 que mide 109 pb y el exón 4 que mide 111 pb, igualmente interferidos por una región intrónica, el segundo par de *primers* se diseñó para amplificar una región de 422 pb (amplicón 2). En el caso particular del exón 5 su longitud excede las 800pb, así que se diseñaron 2 pares de *primers* dividiendo el exón 5. El tercer par de *primers* se diseñó para amplificar la primera mitad del exón 5 con 674 pb (amplicón 3A) y el cuarto par de *primers* se diseñó para amplificar la segunda mitad del exón 5 con 562 pb (amplicón 3B) (Figura 21).

```

5041 ccccaccg caaacagat cggcgtcc gagccccag ccaactggga gggctcggg
5101 ttactgcaag gattctggcg aatgaggtct aaa tagaatg agaagggggg ctgcggaaccg
5161 agaaactgag gcaaggcctg gggcgggagg gtggaggcta agggggaggg gcaggacttc
5221 tcagatgctt gtttaccagg cgctcccctc ccttctctcg cccaatttct gggggtggcc
5281 aagcctggct ggggctggg acgggggaga ctgcactggt ggctccctaa ggggcctcac
5341 ccccaaggca ggggtcggag cacgtggcgt cccggacttc tetgggaggc ccctgggga
5401 gggaggtccc tgcaccacct cccccacc cagccccctc catcatccc gggcgggacc
5461 aagggcggga ggggagggt gacggccgt gacgctgccc ccgcccgtc atatagcggc
5521 tcggggggg gcagggacg tgctccgccc tetccgccc atcttcaccc ctgcgcgccc
5581 ccgcaactcc ccgctctctg gccaccgccc ccgctccc cctcagcggc accgcatgccc
5641 gggagatcgt gcactgacg gccggccagt gcccgaacca gatcggggcc aaggtgctcg
5701 gggaaagggg cccggggagg cagtggcggc cccgggggag accgaggggg cggctcccgg
5761 agcaccccgc aacctgggag tccttggaaa ggaatgaggt ccccaggagg ccagcgcgcc

6181 accggttccc cctctctcaa ctcttccgac cacctctctc tctagttttg ggaggttacc
6241 agtgacgaac atggcatcga ccccacaggc acataccatg gggacagtga cctgcaactg
6301 gagagatca acgtgtacta caaccaggcc acaggtaggg cgaaggaggc acctccaggg
6361 tgggaagggg cagctgggag ggaacaggat gctaccgggc gcctgtggtt cctggcacgcg
6421 atcgaactgc cctccatctg ttccctgca ggaggaaatt atgtcccag agcgggtgctg
6481 gtggacctg aaccggcac catggactct gtccgtctg gccctctcgg tcagatcttt
6541 cggccggaca acttctgttt tggtagtccc cccagcaggg agccagaggc tggaaaacct
6601 ccttattcct gctaacacca cagagtcaac agccaccacc ggggcccaca gaccagagat

11521 agttactagt attcaactac tagaggccct ccaggtgggt gagagacaga gtcaagggtc
11581 ggctcccc ataactgcat gtgtgtcccc tccccttccc tctctaggcc aatccggagc
11641 cggcaacaac tgggcaagg ggcactacac ggaaggcgca gagctggtag acgctgtcct
11701 ggaactgctc cgaaggagg ccgagagctg cgaactgccc cagggttccc agctgaccca
11761 ctgctggggg ggtggcagg ggctccgaaat gggcagcctg ctcatcagta agatccgcga
11821 ggaattccca gaccgcatc tgaacacctt cagcgtgggt ccctcgccca aagtgtcaga
11881 cacggtgggt gagccctaca acgcccagct gtctgtgccc cagctggtag agaatacggg
11941 tgagacctac tgcatcgaca acgagcact ctaagcactc tgtttccgca ccctcaaact
12001 gaccaccccc acctacgggg acctcaacca cctggtgtcg gccaccatga gcggggtcac
12061 cacctgctg cgttcccgg gccagctgaa cgcgcacctg cgaagctgg ccgtcaaat
12121 ggttcccctt cctcgcctgc acttcttcat gcccggttc gcaccctgca ccagcggc
12181 gggccc tgacggtgccc caggttccc cagcagatgt tcgatgccc
12241 gaacatgatg gcggcgtgag acccgcgcca cggccgctac ctgaccgtgg ccgctgtgtt
12301 ccggggcggc atgtccatga aggaggtgga cgaagcagat ctgagcgtgc agagcaagaa
12361 cagcagctac ttcgtggagt ggatcccca caactgtag acggcctgtt gcgacatccc
12421 gccccgccc ctaagatgg ccgcaacctt catcggcaac agcaacggca tccagagctt
12481 gttcaagcgc atctccgagc agttcacggc catgttccgg cgaaggcctt tcttgcaactg
12541 gtacacgggc gagggcattg acagatgga gttcacccag gccagagaca acatgaaatga
12601 cctggtatct gattaccagc agtaccagga cgcaccggcc gaggaggggc agttcgagga
12661 ggaaggcggg gaggaggtgg cctaggtctg tcccatcgtt tcccactgtt cccctcgag
12721 gggggggg t agcccccca tctctgaacc ctgagagccc gctttccctc

```

Figura 21. Secuencia parcial del gen TUBB4A. Las secuencias subrayadas en amarillo corresponden a los 5 exones del gen y las secuencias en verde corresponden a los primers complementarios del amplicón 1 (690pb), en azul claro corresponde a los primers del amplicón 2 (422pb), en rosa corresponde a los primers del amplicón 3A (674pb) y por último en azul fuerte corresponde a los primers del amplicón 3B (562pb).

Los primers utilizados en este estudio fueron elaborados por T4 OLIGO. Todos los pares de primers diseñados tienen en promedio una temperatura de fusión de 60 °C y amplifican en promedio un fragmento de 800 pb, esto permite incluir diferentes muestras en el termociclador para llevar a cabo la PCR (Tabla 6).

Tabla 6. Características de los primers diseñados para este estudio

Primer par de primers para exón 1 y 2				
	Secuencia 5' ->3'	Tamaño	Tm	GC%

Forward primer	TCGCGGTTACTGCAAGGATT	20	60.04	50.00
Reverse primer	AAAGACTCCCAGGTTGCGG	19	59.93	57.89
Segundo par de primers para exón 3 y 4				
Forward primer	CCGGCTCCCCCTCTCTCAA	19	60.99	63.16
Reverse primer	AGGAGGTTTTCCAGCCTCTG	20	59.30	55.00
Tercer par de primers para exón 5 parte I				
Forward primer	GAGAGACAGAGTCAAGGGTTGG	22	60.03	54.55
Reverse primer	TCGAACATCTGCTGGGTGAG	20	59.75	55.00
Cuarto par de primers para exón 5 parte II				
Forward primer	GGGCAGCCAGCAGTACC	17	60.09	70.59
Reverse primer	GCGGATCAAAGGTCAGAAGC	20	59.27	55.00

Evaluar la especificidad de los *primers* a través del análisis PCR semicuantitativo para cada amplicón.

Para evaluar la secuencia de cada amplicón debe cumplir con los siguientes puntos: 1) la banda amplificada debe tener el tamaño correcto, 2) el análisis de secuenciación debe ser de alta calidad, y 3) La enzima Taq polimerasa debe tener alta fidelidad para obtener resultados certeros en la secuencia amplificada.

Amplificación por PCR y secuenciación del amplicón 1

Lograr la amplificación y secuenciación del amplicón 1 fué el mayor reto de los 4 amplicones. Se realizó variación en el uso de 3 enzimas diferentes, se cambió la temperatura de alineación de los *primers* y se probaron diferentes concentraciones de los potenciadores BSA y DMSO. Los electroferogramas obtenidos de la secuenciación es el resultado que permite evaluar y proponer nuevas variaciones en la PCR hasta conseguir una secuencia de alta fidelidad y calidad. Las pruebas de PCR están resumidas en la Tabla 7.

Tabla 7. Resumen de la amplificación por PCR y secuenciación para amplicón 1

PCR	ADN polimerasa	Potenciadores	Volume	TA	Amplifi	Secue	Calidad	Fidelidad	Mutación
Analítica y preparativa									
Ensayo 1	Taq Platinum		20 µl	60 °C	X				
Ensayo 2	Hot St art Taq Master Mix (ADN)		20 µl	60 °C	✓				
Ensayo 2	Taq Polimerase PR 100 Acurris		20 µl	60 °C	X				
Prep. 1	Hot St art Taq Master Mix		150 µL	60 °C	✓	✓	baja		
Ensayo 3	Taq Platinum		100 µl	56 °C	✓	✓	baja		
Ensayo 3	Hot St art Taq Master Mix		20 µl	56 °C	✓	✓	baja		
Ensayo 3	Taq Polimerase PR 100 Acurris		50 µl	56 °C	✓	✓	baja		
Ensayo 4	Taq Platinum	DMSO 5% BSA 10µg/µl	21.2 µl	56 °C	X				

Ensayo 4	Taq Platinum	DMSO 2% BSA 5µg/µl	20.15 µl	56 °C	X				
Ensayo 4	Taq Platinum	DMSO 7%	20.7 µl	56 °C	X				
Ensayo 4	Taq Platinum	DMSO 2%	20 µL	56 °C	X				
Ensayo 4	Taq Platinum	DMSO (control) sin ADN	20 µl	56 °C	X				
Ensayo 5	Taq Platinum	Se añade: 5.46 µl de Mg	26 µl	56 °C	X				
Ensayo 5	Taq Platinum	BSA	20 µL	56 °C	X				
Ensayo 5	Hot Start Taq Master Mix	BSA	20 µL	56 °C	✓	✓	alta	alta	X
Ensayo 5	Hot Start Taq Master Mix	DMSO	20 µL	56 °C	✓	✓	alta	alta	X

En el ensayo 1 no se logró la amplificación del amplicón 1 con la enzima Taq Platinum PCR Super Mix. Se evaluó la enzima Hot Start Taq Master Mix, realizando el ensayo 2 para obtener la proporción de volumen ideal de ADN en la reacción con la enzima Hot Start Taq Master Mix, las muestra con volumen de 0.5 µL de ADN y 3 µL de ADN mostraron mayor intensidad en la banda que la muestra con 1 µL de ADN. Se estandarizó la proporción de 0.5 µL de ADN para una reacción de 20 µL con Hot Start Taq Master Mix (Figura 22).

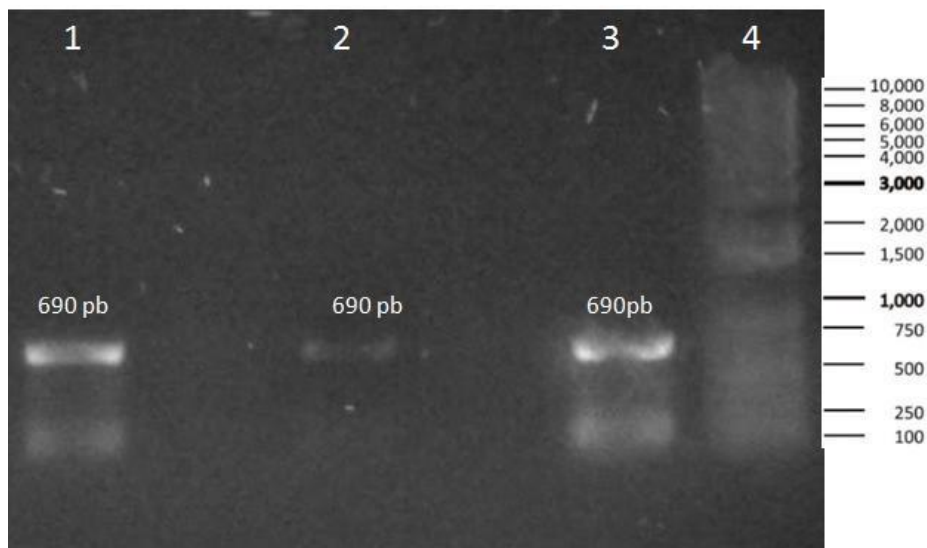


Figura 22. Gel de agarosa del ensayo 2. Obtención del volumen ideal de ADN con Hot Start Taq Master Mix para amplicón 1. 1) Amplificación de la banda, corresponde a la prueba con volumen de 0.5 µL de ADN, 2) Amplificación de la banda, corresponde a la prueba con volumen de 1 µL y 3) Amplificación de la banda, corresponde a la prueba con volumen de 3 µL. 4) Ladder de 1kb.

Para obtener mayor volumen de ADN amplificado se realizó la PCR preparativa 1, incrementado el volumen de reacción a 150 µL con Hot Start Taq Master Mix. Se adquirió la amplificación de la banda, se purificó y secuenció. Los resultados de secuenciación mostraron baja calidad en el electroferograma por lo que no se logró visualizar la secuencia de nucleótidos (Figura 23). Esto se puede deber a la poca cantidad de ADN o al bajo reconocimiento del primer (Forward y Reverse) hacia la secuencia reduciendo la intensidad de señal (Touchman, 2009).

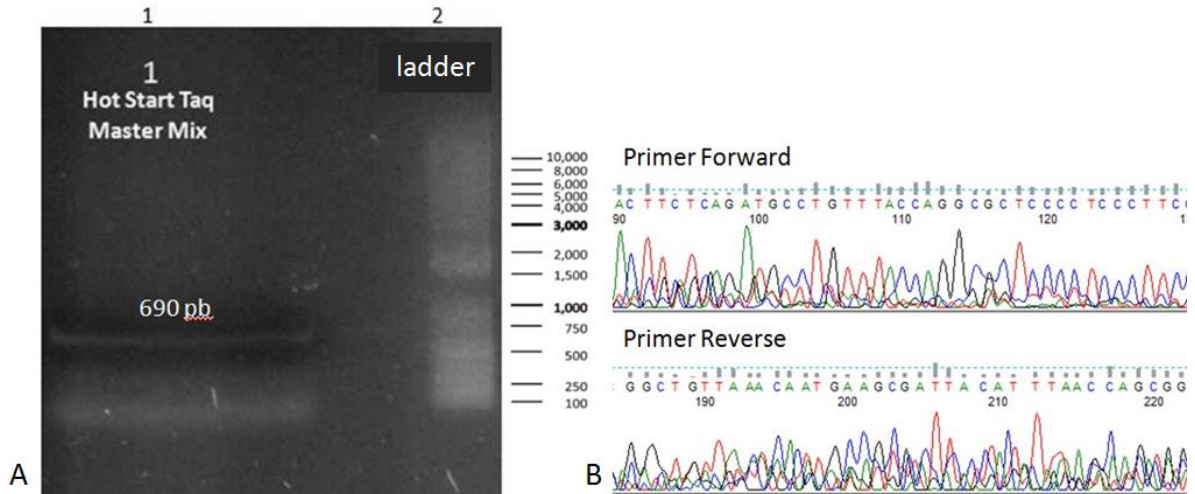


Figura 23. Gel de agarosa de la preparativa 1. (A.1) Banda amplificada del amplicón 1 con *Hot Start Taq Master Mix*, (A.2) Ladder de 1kb. (B) Electroferograma de la secuenciación del amplicón 1 con *Hot Start Taq Master Mix*, presenta ruido y no se discierne las bases.

Con el objetivo de lograr la secuenciación de alta calidad, se modificó la temperatura de alineación de los *primers* a 56 °C en la PCR y se evaluaron 3 reacciones con enzimas diferentes: *Taq Platinum PCR Super Mix*, *Taq Polymerase PR 1000* y *Hot Start Taq Master Mix* con volúmenes de 50 μ L -100 μ L, descrito en el ensayo 3. Se logró la amplificación de las bandas en las 3 reacciones, se purificaron y secuenciaron. Los resultados de secuenciación mostraron baja calidad en los electroferogramas de las 3 reacciones, por lo que no se logró visualizar la secuencia de nucleótidos (Figura 24)

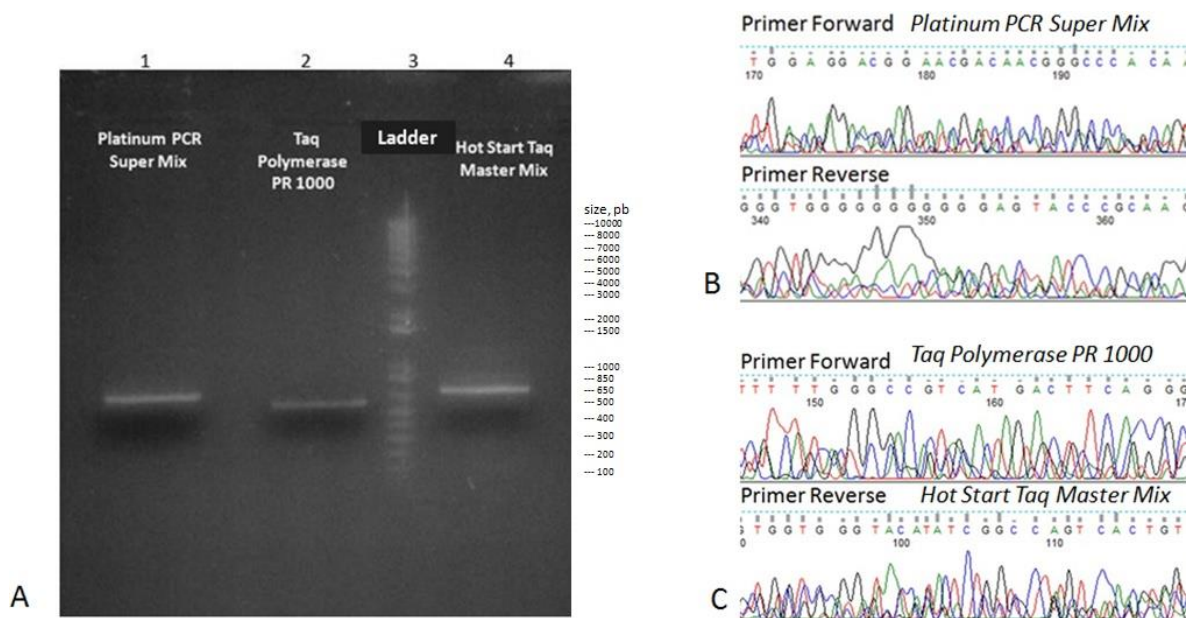


Figura 24. Gel de agarosa del ensayo 3. (A.1) Banda amplificada con *Taq Platinum PCR Super Mix*, (A.2) Banda amplificada con la *Taq Polymerase PR 1000*, (A.3) *Ladder* de 1kb y (A.4) Banda amplificada con *Hot Start Taq Master Mix*. (B) Electroferograma de la secuenciación del amplicón 1 con *Taq Platinum PCR Super Mix*, presenta ruido y no se discierne las bases. (C) Electroferograma de la secuenciación del amplicón 1 con *Taq Polymerase PR 1000* para *p.Forward* y *Hot Start Taq Master Mix* para *p. Reverse*, se muestran con *baja calidad*.

En vista de que no se consiguió una secuenciación de alta calidad con el uso de diferentes enzimas. Se probó la adición de potenciadores en la PCR. El DMSO disminuye la formación de estructuras secundarias y la BSA mejora la PCR como aditivo (Frackman *et al.*, 1998, Kreader, 1996). Las pruebas se realizaron con diferentes concentraciones de BSA y DMSO con la enzima *Taq Platinum PCR Super Mix*. Las pruebas se describen en el ensayo 4. Ninguna de las pruebas logró amplificar la muestra del amplicón 1 pero en el caso de éxito del amplicón 3A se realizaron pruebas con potenciadores y la muestra amplificó con DMSO 2% con la enzima *Taq Platinum*. Las amplificaciones realizadas con la enzima *Hot Start Taq Master Mix* presenta afinidad al amplicón 1 en comparación con la enzima *Taq Platinum*, en base a esta observación se realizó un ensayo con potenciadores y la enzima *Hot Start Taq Master Mix* para amplicón 1: la primera prueba contenía DMSO 2% y la segunda prueba contenía BSA 5 µg/ µl (esta prueba se describe en el ensayo 5). Se logró la amplificación de ambas muestras, se purificaron y secuenciaron. Los resultados de secuenciación mostraron electroferogramas de alta calidad y la secuencia nucleotídica no presentó ninguna mutación en la región del exón 1 y 2 del gen *TUBB4A* (Figura 25).

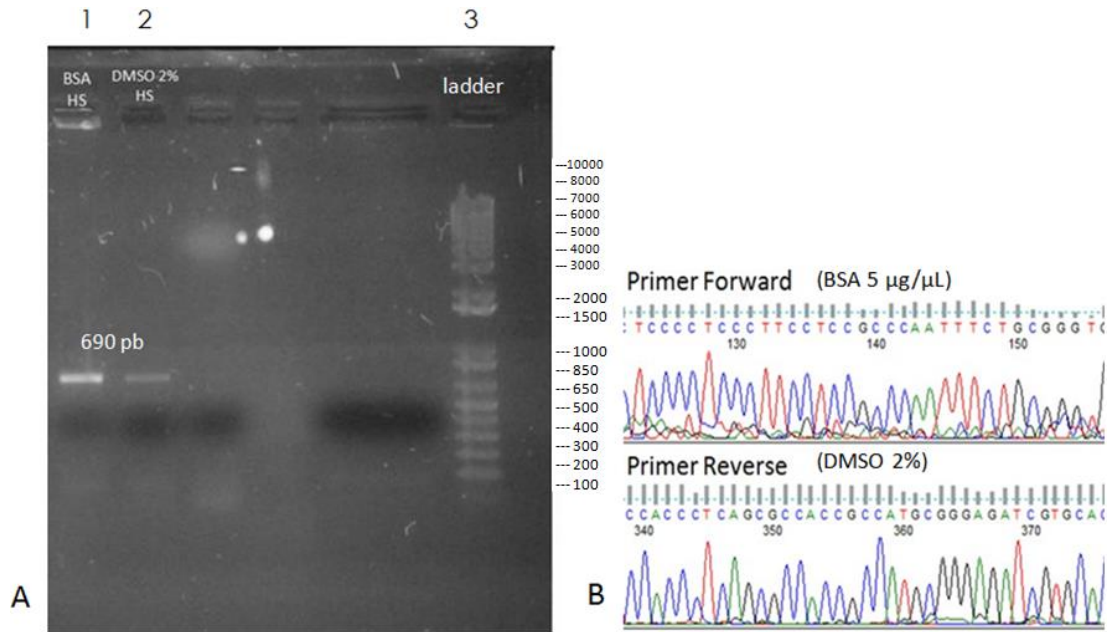


Figura 25. Gel de agarosa, ensayo con potenciadores. (A.1) Banda amplificada con *Hot Start Taq Master Mix* y BSA $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, (A.2) Banda amplificada con *Hot Start Taq Master Mix* y DMSO 2%, (A.3) Ladder de 1 kb. (B) Electroferograma con alta calidad de la secuenciación del amplicón 1 con *Hot Start Taq Master Mix* y BSA $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para el p.*Forward* y *Hot Start Taq Master Mix* con DMSO 2 % para el p. *Reverse*.

Amplificación por PCR y secuenciación del amplicón 2

El amplicón 2 tuvo menor dificultad para amplificar que los demás amplicones. Se realizó una PCR analítica para evaluar la especificidad de primers, cuando se consiguieron las condiciones óptimas se realizó una PCR preparativa para amplificar mayor volumen de ADN y secuenciar. Las pruebas de PCRs están resumidas en la Tabla 8.

Tabla 8. Resumen de la amplificación por PCR y secuenciación para amplicón 2

PCR	ADN polimerasa	Volumen	TA	Amplifica	Secuenciación	Calidad	Fidelidad	Mutación
Analítica				2				
Ensayo 1	Taq Platinum	20 μl	60 °C	✓				
Preparativa								
Prep. 1	Taq Platinum	150 μl	60 °C	✓	✓	alta	alta	X

La evaluación realizada en el *Ensayo 1* mostró especificidad de los primers para el amplicón 2 con la enzima Taq Platinum PCR Super Mix. Para obtener mayor volumen de ADN se realizó la PCR preparativa 1 con volumen de reacción de 150 μL obteniendo la amplificación de la banda, la cual se purificó y secuenció. Los resultados de secuenciación mostraron un electroferograma de alta calidad y la Taq Platinum PCR Super Mix mostró alta fidelidad en

la secuencia, la lectura de los electroferogramas mostró una secuencia sana correspondiente a la región del exón 2 y 3 del gen TUBB4A (Figura 26).

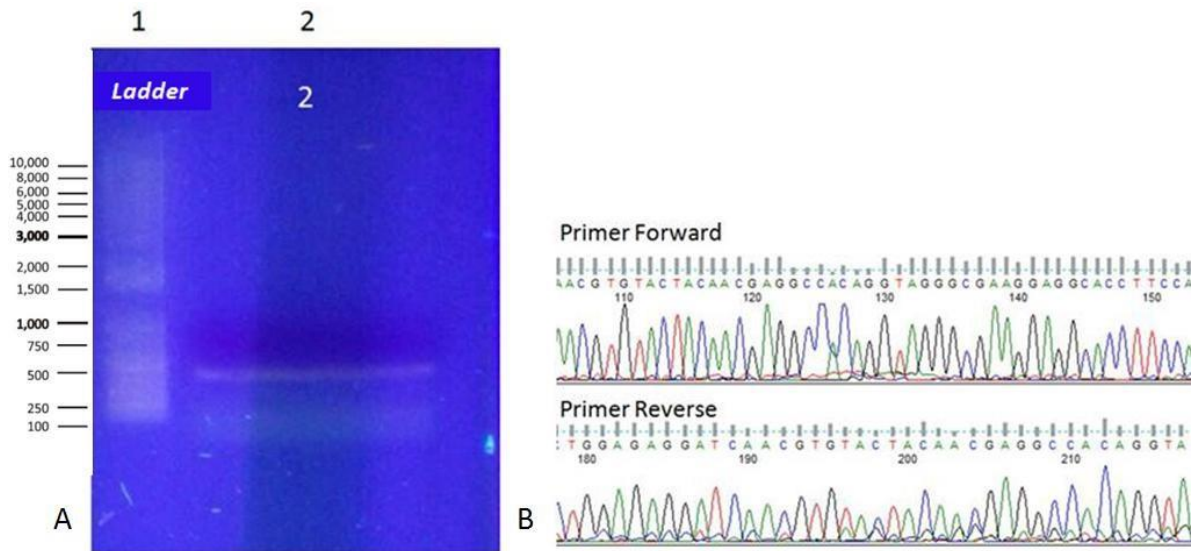


Figura 26. Gel de agarosa de la preparativa 1 con Taq Platinum PCR Super Mix. (A.1) Ladder de 1kb, (A.2) Amplificación de PCR preparativa con Platinum PCR Super Mix. (B) Electroferograma de alta calidad, obtenido de la secuenciación: preparativa 1 con Taq Platinum PCR Super Mix en ambos primers.

Amplificación por PCR y secuenciación del amplicón 3A

Para amplificar y secuenciar el amplicón 3A se utilizaron 2 enzimas diferentes: Taq Platinum PCR Super Mix y Taq Taq Polymerase PR 1000, se cambió la temperatura de alineación de los primers para optimizar la PCR. Finalmente se probaron diferentes concentraciones de los potenciadores BSA y DMSO con Taq Platinum PCR Super Mix, siendo la de mayor fidelidad. La secuenciación de las pruebas con DMSO 2% mostraron un electroferograma con 2 mutaciones puntuales: sinónima y no sinónima en la región del exón 5 en el gen TUBB4A. Las pruebas de PCRs están resumidas en la Tabla 9.

Tabla 9. Resumen de la amplificación por PCR y secuenciación para amplicón 3A

PCR	ADN polimerasa	Potenciadores	Volume	TA	Ampli	Secuenci	Calidad	Fidelidad	Mutación
Analítica y preparativa					3A				
Ensayo 1	Taq Platinum		20 µl	60 °C	✓				
Prep. 1	Taq Platinum		150 µl	60 °C	✗				
Prep. 2	Taq Platinum		100 µl	56 °C	✗				
Prep. 2	Taq Polymerase PR 100 Acurris		50 µl	56 °C	✓	✓	alta	baja	
Prep. 3	Taq Polymerase PR 100 Acurris		50 µl	56 °C	✗				
Ensayo 4	Taq Platinum	DMSO 5% BSA 10µg/µl	21.2 µl	56 °C	✗				
Ensayo 4	Taq Platinum	DMSO 2% BSA 5µg/µl	20.15 µl	56 °C	✗				

Ensayo 4	Taq Platinum	DMSO 7%	20.7 µl	56 °C	X				
Ensayo 4	Taq Platinum	DMSO 2%	20 µL	56 °C	✓				
Ensayo 4	Taq Platinum	DMSO (control) sin ADN	20 µl	56 °C	X				
Prep. 4	Taq Platinum	DMSO 2%	50 µl	56 °C	✓	✓	alta	alta	✓
Prep. 5	Taq Platinum	DMSO 2%	100 µl	56 °C	✓	✓	alta	alta	✓

Se evaluó la especificidad de los primers en el amplicón 3A de la PCR analítica en el ensayo 1, logrando su amplificación. Con el objetivo de amplificar mayor volumen de ADN, se realizó una PCR preparativa con la enzima *Taq Platinum*, descrita en preparativa 1, pero no logró amplificar. Siguiendo el mismo objetivo se realizó una PCR preparativa disminuyendo la temperatura de alineación de los *primers* a 56 °C y probando 2 enzimas: *Taq Platinum PCR Super Mix* y *Taq Polymerase PR 1000*, prueba descrita en preparativa 2. La muestra con *Taq Platinum PCR Super Mix* no amplificó bajo esas condiciones, pero la muestra de la Preparativa 2 con la *Taq Polymerase PR 1000* logró amplificar. La muestra se purificó y secuenció obteniendo electroferogramas de baja calidad, lo cual se puede deber a la baja cantidad de ADN o bajo reconocimiento del *primer* hacia la secuencia reduciendo la intensidad de señal (Touchman, 2009) (Figura 27).

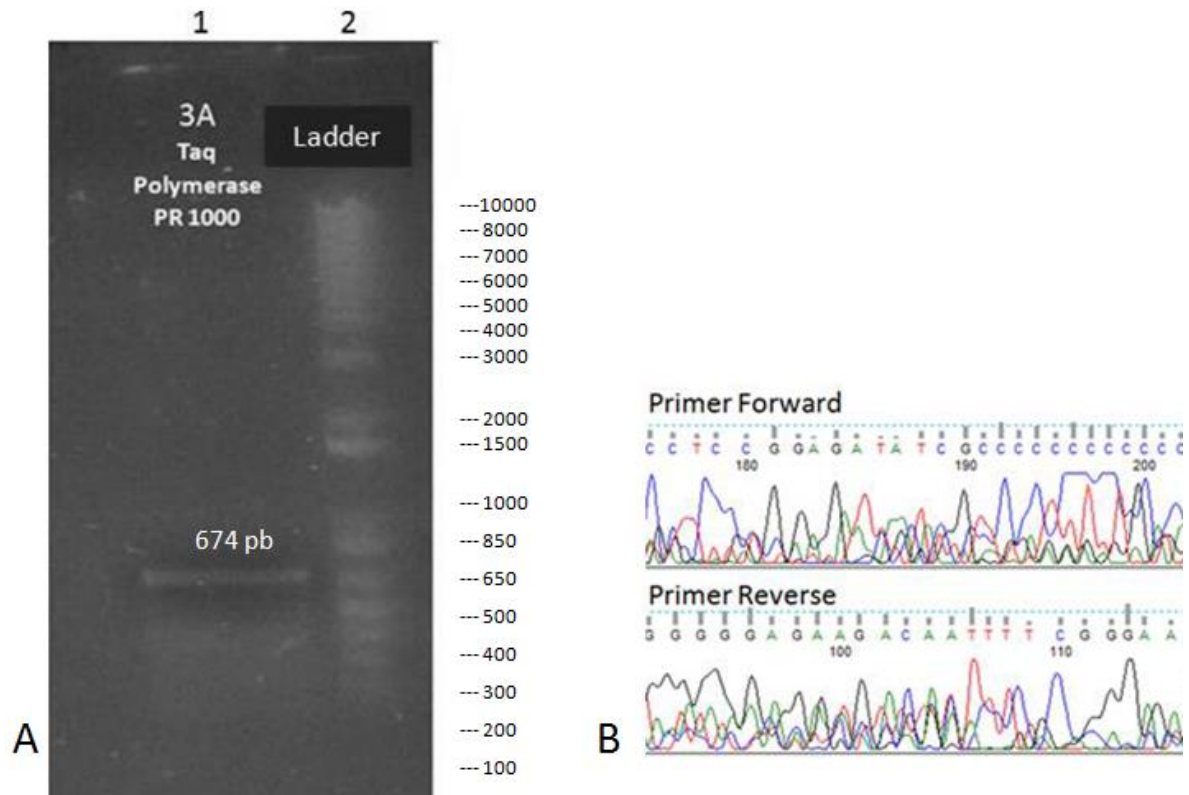


Figura 27. Gel de agarosa amplificación del amplicón 3A con *Taq Polymerase PR 1000*. (A.1) Banda amplificada con *Taq Polymerase PR 1000*, (A.2) *Ladder* de 1kb. (B) Electroferogramas de baja calidad, corresponden a la secuenciación del amplicón 3A con *Taq Polymerase PR 1000*.

La amplificación con *Taq Polymerase PR 1000* en amplicón 3A se realizó simultáneamente con el amplicón 3 B, y el electroferograma de alta calidad en amplicón 3B, mostró errores en la secuencia, debido a la baja fidelidad de la *Taq Polymerase PR 1000*. Con el objetivo de amplificar la secuencia con una enzima de alta calidad, se realizaron pruebas con la enzima *Taq Platinum PCR Super Mix* y diferentes concentraciones de los potenciadores BSA y DMSO, las pruebas están descritas en el Ensayo 4. De las pruebas realizadas en el Ensayo 4, el amplicón 3A logró amplificar con la *Taq Platinum PCR Super Mix* y DMSO 2% (Figura 28).

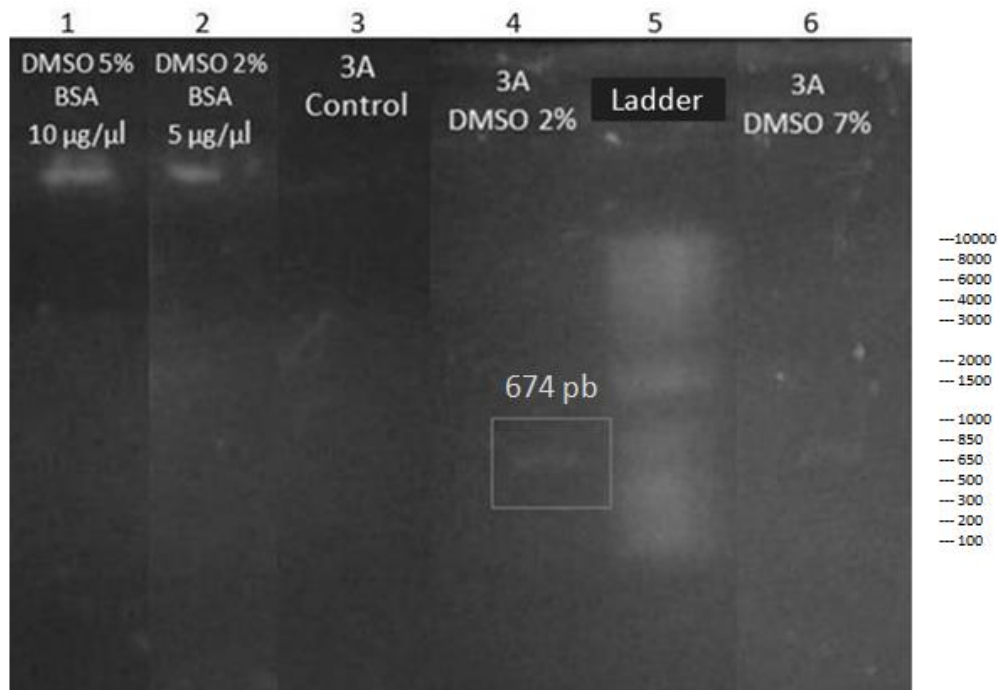


Figura 28. Fotocomposición del gel de agarosa del ensayo 4 en amplicón 3A. (1) Prueba con DMSO al 5% y BSA de 10 µg/ µL, (2) Prueba con DMSO al 2% y BSA de 5 µg/ µL, (3) control, (4) Banda amplificada con DMSO al 2% , (5) Ladder de 1 kb y (6) Prueba con DMSO al 7%. En el carril 1 y 2, las muestras realizadas con DMSO y BSA tomaron una consistencia espesa sin migrar del pozo.

Las condiciones del ensayo 4 fueron óptimas para el amplicón 3A con DMSO 2%. Para obtener mayor volumen de ADN. Se realizó una PCR conservando las mismas condiciones que el ensayo anterior pero incrementando el volumen de reacción a 50 µL, descrita en *Preparativa 4*. La preparativa con DMSO 2% amplificó la muestra, se purificó y se secuenció. Los resultados de secuenciación mostraron electroferogramas con barras grises altas, indicador de alta calidad y la secuencia presentó alta fidelidad permitiendo identificar 2 mutaciones puntuales: una sinónima y otra no sinónima. El alelo con mutación sinónima cambia la secuencia nucleotídica de GTT por GTC sintetizando para el mismo aminoácido

258, una valina (Val). Este alelo ya está registrado en ClinVar con el ID: 349435. El alelo con mutación no sinónima cambia la secuencia nucleotídica de GAC por AAC, modificando el aminoácido del ácido aspártico (Asp/D) por una asparangina (Asn/N) en la posición 249. Está mutación patogénica es la responsable del fenotipo H- ABC (Simons *et al.*, 2013). Los dos picos de color: verde y negro traslapados a la misma altura en el electroferograma señalado con flecha roja son indicador de heterocigosis, es decir que los dos alelos del gen son distintos. Un alelo tiene la secuencia con el nucleótido A representado con el pico verde y el otro alelo tiene el nucleótido G en su secuencia representado con el pico negro (Figura 29).

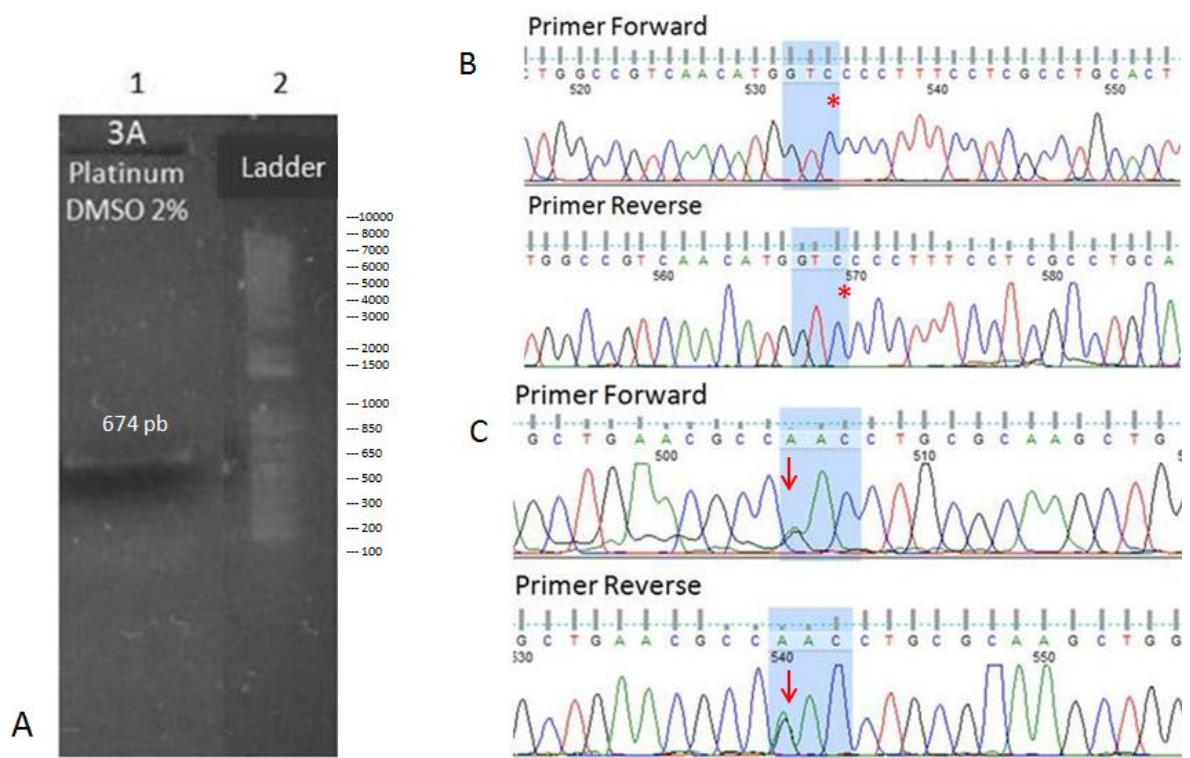


Figura 29. Fotocomposición del gel de agarosa del amplicón 3A con DMSO 2%. (A1) Banda amplificada con Platinum PCR Super Mix con DMSO 2% y (A.2) Ladder de 1kb. (B) Electroferogramas de la secuenciación con Platinum PCR Super Mix con DMSO 2%, se muestra la mutación puntual sinónima en ambos electroferogramas señalada con asterisco rojo. (C) Electroferogramas de la secuenciación con Platinum PCR Super Mix con DMSO 2%, se muestra la mutación patogénica señalada con flecha roja en ambos electroferogramas (p.Forward y p.Reverse).

Para corroborar la mutación patogénica, se realizó la preparativa 5 con las mismas condiciones. La muestra amplificó, se purificó y se secuenció con el p. Reverse, ya que la mutación está situada en las últimas bases del amplicón 3A. El electroferograma muestra la mutación patogénica en la misma posición que los electroferogramas anteriores, comprobando el resultado obtenido (Figura 30).

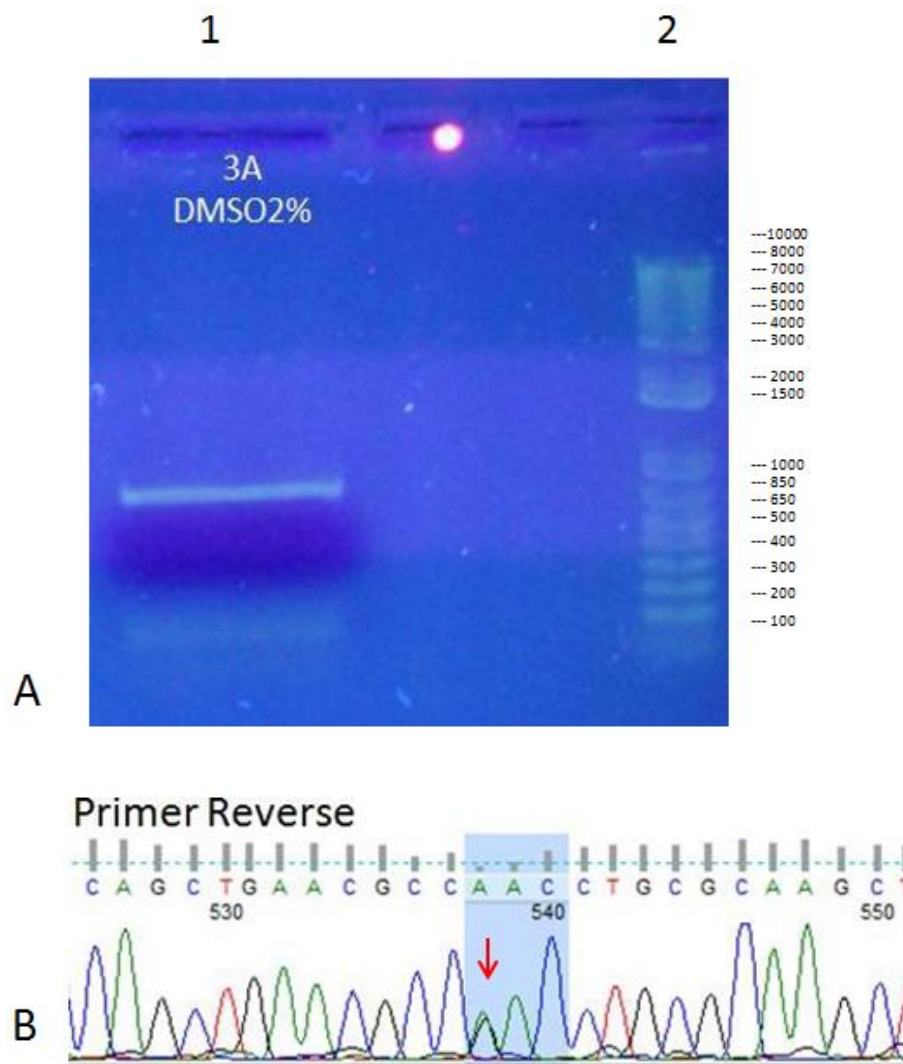


Figura 30. Gel de agarosa del amplicón 3A con DMSO 2%. (A.1) Banda amplificada con *Platinum PCR Super Mix* y DMSO 2%, (A.2) *Ladder* de 1kb. (B) Electroferograma obtenido de la secuenciación de la preparativa 5 con *p.Revers*, se muestra la mutación patológica señalada con flecha roja.

Amplificación por PCR y secuenciación del amplicón 3B

Los primers mostraron especificidad en el amplicón 3B en la PCR analítica, con este resultado se realizó una PCR preparativa para obtener mayor volumen de ADN, la cual se purificó y secuenció mostrando una mutación en uno de los electroferogramas. Esta incertidumbre llevo a realizar nuevas pruebas de PCR para comprobar la mutación. Se modificó la temperatura de alineación de los primers, se cambió la enzima y se realizaron pruebas con los potenciadores DMSO y BSA. Finalmente se logró secuenciar la muestra con

alta calidad y fidelidad de la enzima, comprobando que no existe mutación en la secuencia del amplicón 3B. Las pruebas de PCRs están resumidas en la Tabla 10.

Tabla 10. Resumen de la amplificación por PCR y secuenciación para amplicón 3B.

PCR	ADN polimerasa	Potenciadores	Volumen	TA	Amplificación	Secuencia	Calidad	Fidelidad	Mutación
Análítica y preparativa					3B				
Ensayo 1	Taq Platinum		20 µl	60 °C	✓				
Prep. 1	Taq Platinum		150 µl	60 °C	✓	✓	alta	alta	?
Prep. 2	Taq Platinum		100 µl	56 °C	✗				
Prep. 3	Taq Polymerase PR 100 Acurris		50 µl	56 °C	✓	✓	alta	baja	
Ensayo 4	Taq Platinum	DMSO 5% BSA 10µg/µl	21.2 µl	56 °C	✗				
Ensayo 4	Taq Platinum	DMSO 2% BSA 5µg/µl	20.15 µl	56 °C	✓				
Ensayo 4	Taq Platinum	DMSO (control) sin ADN	20 µl	56 °C	✗				
Prep. 4	Taq Platinum	DMSO 2%	50 µl	56 °C	✓	✓	alta	alta	✗

La evaluación realizada en el *Ensayo 1* mostró especificidad de los primers para el amplicón 3B con la enzima Taq Platinum PCR Super Mix. Para obtener mayor volumen de ADN se realizó la PCR preparativa 1 con volumen de reacción de 150 µL obteniendo la amplificación de la banda, la cual se purificó y secuenció. Los resultados de secuenciación mostraron un electroferograma de alta calidad y la Taq Platinum PCR Super Mix mostró alta fidelidad en la secuencia, sin embargo, el electroferograma secuenciado con el *p.Reverse* mostró una mutación modificando el nucleótido C por G en heterocigosis, la cual está ausente en el electroferograma del *p.Forward*. Debido a que los electroferogramas no son consistentes, no es posible corroborar si la secuencia se encuentra sana o con mutación en esta región del gen TUBB4A (Figura 31).

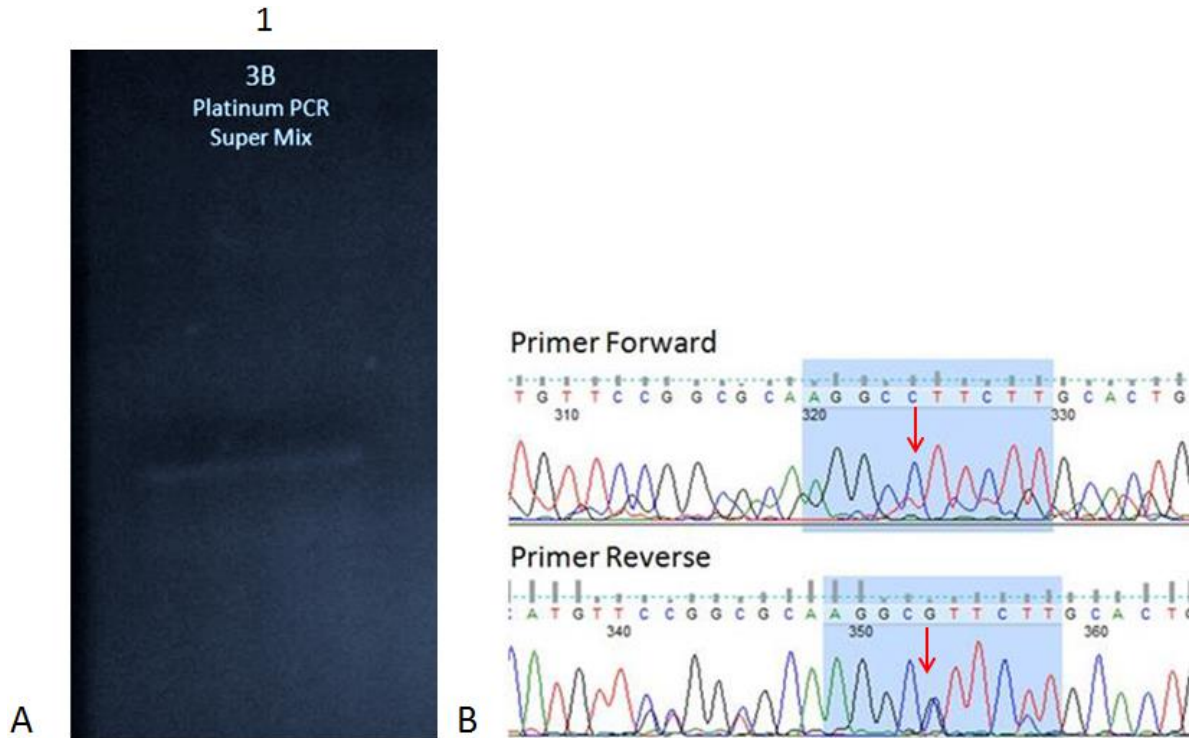


Figura 31. Gel de agarosa, preparativa 1 del amplicón 3B con Taq Platinum PCR Super Mix. (A.1) Banda amplificada del amplicón 3B con Taq Platinum PCR Super Mix. (B) Electroferogramas de la secuenciación del amplicón 3B con Taq Platinum PCR Super Mix. El electroferograma con *p.Reverse* muestra una posible heterocigosis con cambio de nucleótido C por G señalado con la flecha roja, el electroferograma con *p.Forward* no coincide con el resultado mostrado en *p.Forward*, el nucleótido permanece en C, señalado con flecha roja.

Para reiterar la mutación mostrada en la preparativa 1 (Figura 31), se realizó la amplificación con Taq Platinum disminuyendo la temperatura de alineación de los *primers* a 56 °C con volumen de 100 µL descrita en preparativa 2, pero no se logró amplificar. Así que se realizó una prueba cambiando la enzima Taq Platinum por la enzima Taq Polymerase PR 1000 en una reacción de 50 µL descrita en preparativa 3. Esta prueba logró amplificar la muestra, se purificó y secuenció. Los resultados obtenidos de la secuenciación mostraron electroferogramas de alta calidad pero la secuencia nucleotídica no fue consistente entre electroferogramas, la Taq Polymerase PR 1000 creó 40 nucleótidos falsos positivos, evidenciando la baja fidelidad de la enzima (Figura 32).

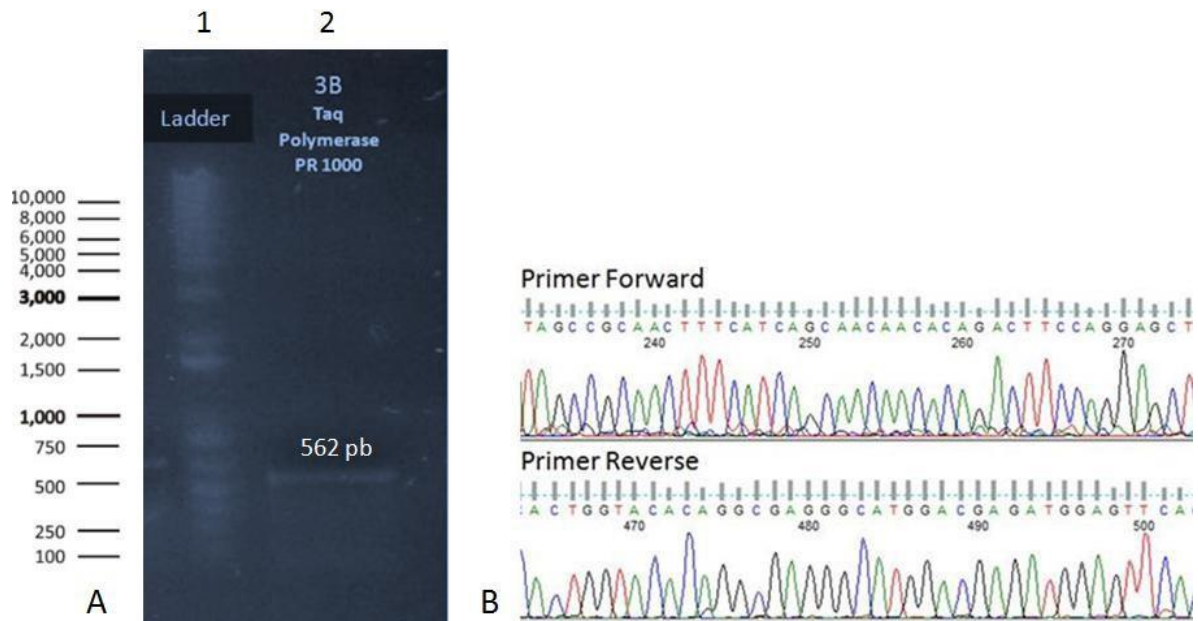


Figura 32. Gel de agarosa, preparativa 3 del amplicón 3B con Taq Polymerase PR 1000 (A.1) Ladder de 1kb, (A.2) Banda amplificada con Taq Polymerase PR 1000. (B) Electroferogramas con alta calidad de la secuenciación del amplicón 3B con Taq Polymerase PR 1000.

Se requiere de una enzima con alta fidelidad para la visualización confiable de la secuencia nucleotídica. La enzima Taq Platinum tiene mayor fidelidad que la enzima *Taq Polymerase PR 1000*. Para conseguir la amplificación con la enzima Taq platinum se probó la adición de potenciadores en la PCR, utilizando diferentes concentraciones de BSA y DMSO, las pruebas de la PCR analítica con potenciadores está descrita en el ensayo 4. Ninguna de las pruebas logró la amplificación del amplicón 3B; sin embargo, el caso de éxito en el amplicón 3A, la muestra amplificó con una concentración de DMSO 2%, está prueba no había sido realizada en el amplicón 3B. Se realizó una PCR con volumen de 50 μ l con la enzima Taq Platinum y DMSO 2%, prueba descrita en preparativa 4. Se logró la amplificación de la muestra, se purificó y secuenció. Los resultados de la secuenciación mostraron electroferogramas de alta calidad y las secuencias mostraron alta fidelidad con la Taq Platinum. La lectura de la secuencia nucleotídica de ambos electroferogramas (*p. Forward* y *p. Reverse*) indican que el gen TUBB4A carece de mutación en la región del exón 5 eliminando la sospecha anterior de alguna mutación (Figura 33).

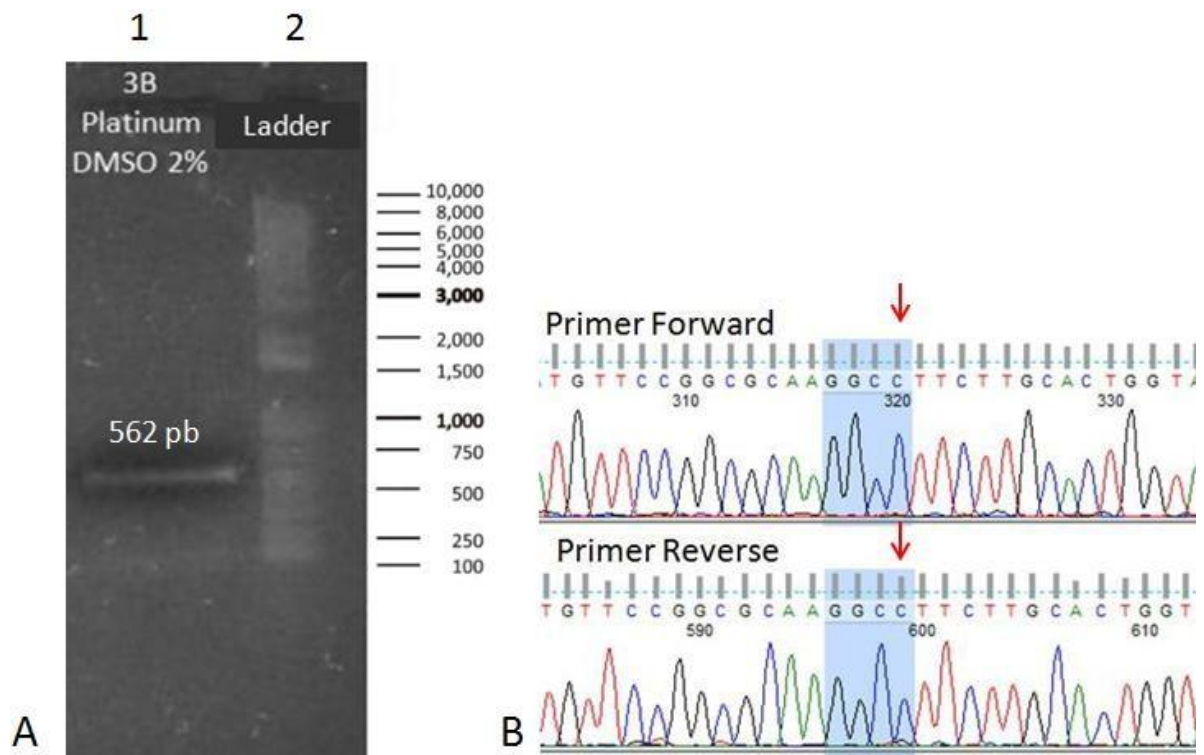


Figura 33. Gel de agarosa, preparativa 4 del amplicón 3B con Taq Platinum PCR Super Mix y DMSO 2%. (A.1) Banda amplificada con Taq Platinum PCR Super Mix y DMSO 2%, (A. 2) Ladder de 1 kb. (B) Electroferogramas con alta calidad de la secuenciación del amplicón 3B con Taq Platinum PCR Super Mix y DMSO 2%, la flecha roja señala el nucleótido C indicando que no hay ninguna mutación y ambos electroferogramas son consistentes.

Discusión

EL análisis genético realizado en este estudio ha demostrado que la mutación responsable del fenotipo H-ABC en el paciente se debe a la mutación típica p.Asp249Asn en TUBB4A con heterocigosis (Figura 30). Esta mutación ya había sido descrita en más de un estudio y es la más común en los pacientes que padecen H-ABC (Simons *et al.*, 2013, Ferreira *et al.*, 2014, Hamilton *et al.*, 2014, Miyatake *et al.*, 2014). Debido a que no se poseen muestras genéticas de los padres, no se puede confirmar si el origen de la mutación es espontánea, es decir, mutación *de novo* (Samocha *et al.*, 2014) como en la mayoría de los casos o se trata de mosaicismo materno, como en el caso de los hermanos descrito anteriormente (Simons *et al.*, 2013) o en el caso descrito, de una madre asintomática portadora de la enfermedad con hijos enfermos, la cual no fue posible corroborar (Hamilton *et al.*, 2014).

Mutación típica p.Asp249Asn en TUBB4A

Los heterodímeros de α - y β - tubulina se ensamblan para formar microtúbulos. La TUBB4A se expresa mayormente en el cerebelo, el putamen y la sustancia blanca supra- tentorial (Hersheson *et al.*, 2013, Leandro-García *et al.*, 2010). La región Asp249 en TUBB4A está ubicado dentro del bucle TUBB4A T7, que interactúa con el nucleótido de guanósín trifosfato (GTP) unido al sitio N de la α -tubulina, la cual es importante para la interacción longitudinal entre tubulinas (Figura 34) (Simons *et al.*, 2013, Love *et al.*, 2001). Es probable que la mutación p.Asp249Asn en TUBB4A puede interrumpir el crecimiento neuronal o la función axonal, generada por una dimerización ineficiente, reduciendo el ensamblado y polimerización de los microtúbulos (Simons *et al.*, 2013).

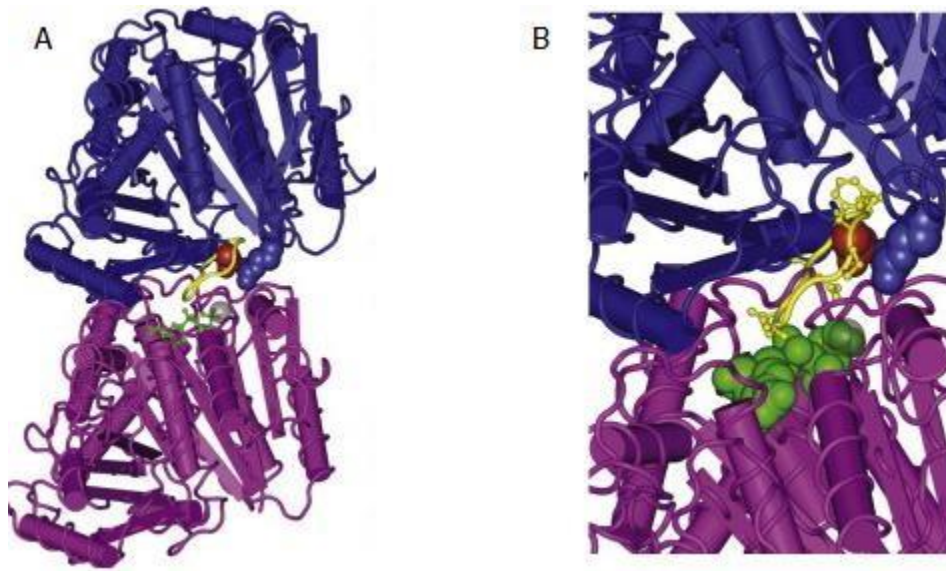


Figura 34. Estructura del heterodímero con la mutación Asp249. A) α -tubulina en color morado y β -tubulina en color azul B) estructura ampliada del heterodímero de tubulina, guanosín trifosfato (GTP) en color verde, el residuo Asp249 se muestra como esferas rojas y el lazo T7 se muestra en amarillo. Se muestra el rol de Asp249 con el lazo T7 y el GTP (Simons *et al.*, 2013).

Dificultad de diagnóstico por PCR para H-ABC

El diagnóstico genético en pacientes con H-ABC se realiza a través de dos enfoques. Cuando el paciente muestra características de H-ABC en la RM y en los hallazgos clínicos, los médicos realizan pruebas dirigidas al gen TUBB4A o a un panel de genes probablemente involucrados, mientras que los pacientes con un fenotipo indistinguible de otras leucodistrofias hipomielinizantes, se diagnostican mediante pruebas genómicas que involucren el ADN de todos los cromosomas (Nahhas *et al.*, 2016). Se han reportado mutaciones puntuales y de duplicación en TUBB4A. Las duplicaciones se han detectado con el análisis de ligamiento genético (GWLA) y análisis de microarreglos cromosómicos (CMA); sin embargo, en el método CMA, cada laboratorio interpreta sus variables patogénicas, siendo de único remitente las duplicaciones reportadas en la base de datos ClinVar. Las mutaciones puntuales reportadas en el gen TUBB4A se han diagnosticado a través de los métodos: Secuenciación del exoma (Hamilton *et al.*, 2014, Blumkin *et al.*, 2014, Pizzino *et al.*, 2014, Purnell *et al.*, 2014) y secuenciación dirigida a un panel de múltiples genes (de Gusmão *et al.*, 2016). Ningún paciente reportado con H-ABC había sido diagnosticado genéticamente con la herramienta de PCR. El análisis por PCR

semicuantitativo implementado en este estudio permitió identificar la mutación del paciente, acertando el diagnóstico clínico H-ABC asociado al gen TUBB4A. Realizar PCR para diagnóstico clínico, mostró dificultad para amplificar 3 de las 4 secuencias de interés, se ajustó la temperatura de alineación, pero no mostró una mejora en la amplificación de las muestras. Así que se cambió la enzima *Taq Platinum PCR Super Mix* por la *Taq Polymerase PR 1000*, la cual logró amplificar las secuencias, pero presentó baja fidelidad en el electroferograma de secuenciación de alta calidad. Se volvió a utilizar la *Taq Platinum PCR Super Mix* de alta fidelidad, pero no se consiguió la amplificación. Para optimizar la PCR, se realizaron pruebas utilizando diferentes concentraciones de los potenciadores: BSA y DMSO. Cuando se usan solventes orgánicos como el DMSO en conjunto con la BSA, la BSA actúa como un poderoso co-potenciador de la amplificación por PCR en las plantillas de ADN obteniendo mayor rendimiento (Farell and Alexandre, 2012). La combinación de ambos reactivos en una misma reacción no mejoró el rendimiento en ninguna de las concentraciones probadas. En un estudio no hubo efecto significativo en la PCR al agregar BSA solo como aditivo (Farell and Alexandre, 2012). El uso de un potenciador individual para cada reacción mostró mejora en el rendimiento de la PCR, obteniendo las concentraciones óptimas de BSA 5 µg/ µl y DMSO 2%. Los amplicones 3A y 3B amplificaron con la enzima *Platinum PCR Super Mix* y DMSO 2%. En el amplicón 1, La enzima *Platinum PCR Super Mix* no mostró afinidad en ninguna de las pruebas. Por lo que se cambió la enzima *Platinum PCR Super Mix* por la *Hot Start Taq Master Mix de alta fidelidad*. Una reacción se optimizó con BSA 5 µg/ µl y otra reacción con DMSO 2%. Ambas muestras amplificaron óptimamente la secuencia y se obtuvo una secuenciación de alta calidad. De acuerdo con la evidencia mostrada en este estudio, se sugiere la detección por PCR, cuando la condición del paciente se asocia a un gen específico (Goswami and Harada, 2020). En el diagnóstico genético por PCR es indispensable el uso de enzimas de alta fidelidad. Los potenciadores BSA 5 µg/ µl y DMSO 2% contribuyen a la optimización de la PCR sin generar cambios negativos en la secuencia.

Correlación genotipo-fenotipo

Se ha propuesto que los pacientes diagnosticados con H-ABC y con genotipos diferentes a p.Asp249Asn en TUBB4A presentan efectos más severos. Esta observación se sugirió por primera vez en 2014, donde a través de un estudio se identificó un grupo de pacientes con mutación distinta a la común en TUBB4A, el 24% presentaron los primeros signos a una edad más temprana, ninguno de los pacientes logró caminar sin apoyo y desarrollaron atrofia

cerebral y callosa grave. Mientras que los pacientes con la mutación común lograron movimiento intencional y solo desarrollaron una de las anomalías pero con efecto menor (Hamilton *et al.*, 2014). Más tarde en el mismo año, esta propuesta fue reforzada por un estudio en el cual se identificaron a dos pacientes con anomalía del movimiento extrapiramidal a temprana edad, esta es una manifestación clínica clave en pacientes con H-ABC y es causada por mutaciones distintas a la típica en TUBB4A (Carvalho *et al.*, 2014). Purnell *et al.* Identificaron la mutación p.R156L en TUBB4A, no reportada. Los síntomas del paciente aparecieron a temprana edad y severos, la RM indica leucodistrofia hipomielinizante estática sin atrofia en los ganglios basales, característica que difiere del fenotipo H-ABC (Purnell *et al.*, 2014). Otro ejemplo es la mutación reportada p.Glu410Lys en TUBB4A presente en 2 pacientes con RMs similares a los pacientes con mutaciones POLR3A o POLR3B. Los ganglios basales estaban preservados pero los signos extrapiramidales que presentaban son atípicos en las mutaciones de POLR3A o POLR3B. Esta mutación (p.Glu410Lys) afecta las interacciones de proteínas motoras, mientras que las mutaciones en pacientes con H-ABC parecen afectar interacciones longitudinales para mantener la estructura de la tubulina (Miyatake *et al.*, 2014). Miyatake *et al.* Sugieren las anomalías extrapiramidales como clave para promover el análisis genético de TUBB4A en pacientes con leucoencefalopatía desmielinizante desconocida, aún si no se observa atrofia cerebelosa (Miyatake *et al.*, 2014) como se trata de una enfermedad neurodegenerativa, los signos extrapiramidales pueden aparecer a temprana edad y conforme avanza la enfermedad se presentan las anomalías en el cerebro (Hamilton *et al.*, 2014). Si existen casos que presentaran características adicionales como la hipomielinización, la atrofia del putamen o la atrofia cerebelosa son condiciones que refuerzan esta indicación (Hamilton *et al.*, 2014, Miyatake *et al.*, 2014). Blumkin *et al.* Describen el fenotipo de un paciente portador de la mutación p. E410K en TUBB4A no reportada, el paciente presentó combinación de síntomas extrapiramidales, hipomielinización regional sin evidencia de ganglios basales atrofiados en su RM característica que difiere del fenotipo clásico de H-ABC, también presentó problemas en el comportamiento asociado a pacientes con distonía DYT4 (Parker, 1985). Este cuadro clínico-radiológico contribuye a entender la variación fenotípica de síndromes en TUBB4A (Blumkin *et al.*, 2014). En otro estudio se secuenció el exoma de 5 pacientes con características de RMs similares, ninguno presentó ganglios basales atrofiados, pero si presentaron hipomielinización. Se identificaron 4 mutaciones no reportadas en TUBB4A: p.Val255Ile, p.Q292K, p.Arg391His y, p.Arg282Pro presente en dos hermanos con 5 décadas de deterioro neurológico, el putamen no se mostró atrofiado (Pizzino *et al.*, 2014). Ero *et al.* Sugieren que las mutaciones p.Q292K y p.Val255Ile tienen un impacto similar como la mutación típica de H-ABC (p.Asp249Asn)

donde la polimerización y la estabilidad de la tubulina se ve afectada (Erro *et al.*, 2015). Las enfermedades desmielinizantes en pacientes jóvenes deben monitorearse ya que con el tiempo se podrían generar características de imagen compatibles con H-ABC. Recientemente, en otro estudio se identificó la mutación p.Thr178Arg presentando características de H-ABC pero más severas a las afecciones que produce la mutación típica p.Asp249Asn (Joyal *et al.*, 2018). Erro *et al.*, Miyatake *et al.* y Hamilton *et al.* Sugieren que el movimiento extrapiramidal es una característica distintiva del síndrome H-ABC, a diferencia de los síntomas cerebelosos y la espasticidad son manifestaciones típicas de otros trastornos hipomielinizantes (Erro *et al.*, 2015). (Miyatake *et al.*, 2014, Hamilton *et al.*, 2014). Las mutaciones en el gen TUBB4A están asociadas a los fenotipos: la distonía tipo 4 (DYT4) y H-ABC. Estos fenotipos se han tratado como patologías diferentes, pero hay casos en pacientes diagnosticados con H-ABC que coinciden en las características clínicas de los pacientes con DYT4, pero con efecto menor (Simons *et al.*, 2013, Hamilton *et al.*, 2014, Wilcox *et al.*, 2011). Autores sugieren que H-ABC y DYT4 podría tratarse del mismo espectro fenotípico asociado con mutaciones en TUBB4A (Erro *et al.*, 2015).

Conclusión

A través de este estudio genético se concluye que el uso de enzimas de ADN polimerasa con alta fidelidad son indispensables en el diagnóstico genético por PCR para obtener copias idénticas al ADN del paciente; Los potenciadores: DMSO y el BSA son efectivos para incrementar el rendimiento de la PCR. Se validó la hipótesis planteada, identificando la mutación Asp249Asn en el gen TUBB4A del paciente diagnóstico clínicamente con H-ABC. Hasta donde tenemos conocimiento este es el primer caso comprobado de este tipo de patologías en México. Este hallazgo es importante porque contribuye a generar conocimiento útil para neuropediatras y neurofisiólogos en el país puedan asociar este tipo de patologías a sus pacientes y encontrar nuevos casos. Asimismo, permitirá qué

pacientes diagnosticados con otras patologías puedan ser rediagnosticados y así, ampliar el espectro genotipo-fenotipo para entender estas enfermedades, proporcionar tratamientos más específicos y a futuro desarrollar un tratamiento adecuado para los pacientes.

Capítulo II: “Estrategia molecular para diagnóstico genético en pacientes con fenotipos asociados a tubulinopatías”

Antecedentes

Tubulinopatías

Las tubulinopatías son malformación cerebrales de reciente descripción, causadas por la mutación en alguno de los genes de tubulina (Romero *et al.*, 2018). Las primeras tubulinopatías se descubrieron a través del mapeo genético en pacientes con trastornos de lisencefalia en TUBA1A (Keays *et al.*, 2007) y polimicrogiria (PMG) en TUBB2B (Jaglin *et al.*, 2009). Actualmente, el fenotipo de los pacientes con tubulinopatías se caracterizan por un amplio espectro en los trastornos que incluyen lisencefalia, polimicrogiria, patrones girales ligeramente simplificados y microcefalia (Fallet-Bianco *et al.*, 2014). Las características clínicas incluyen discapacidades motoras e intelectuales, epilepsia, convulsiones y deficiencias oculares (Bahi-Buisson and Cavallin, 2016). Sin embargo, se desconoce el espectro fenotípico completo de las tubulinopatías por lo que se sigue explorando (Yuen *et al.*, 2019).

Las tubulinopatías son causadas por la mutación de uno de los nueve genes que codifican diferentes isotipos de tubulina (Tabla 11): α -tubulina (principalmente TUBA1A, TUBA8 y TUBA3E), β -tubulina (TUBB2B , TUBB2A, TUBB3, TUBB) y γ - tubulina (TUBG1) (Bahi-Buisson *et al.*, 2014, Cushion *et al.*, 2014, Jaglin *et al.*, 2009, Keays *et al.*, 2007, Poirier *et al.*, 2013). Las mutaciones en el gen TUBB4A no producen malformaciones corticales como las demás tubulinopatía, su espectro fenotípico varía de la distonía hereditaria generalizada con disfonía susurrante (DYT-TUBB4A), paraplejia espástica hereditaria (HSP) e hipomielinización con atrofia de los ganglios basales y cerebelo (Hamilton *et al.*, 2014), también incluye un espectro de anomalías del movimiento extrapiramidales (Hamilton *et al.*, 2014, Nahhas *et al.*, 2016, Vulinovic *et al.*, 2018). La comparación de RMs de pacientes con mutaciones conocidas de genes de tubulina y proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) como: LIS1 y DCX permiten establecer correlaciones de fenotipo con genotipo para ayudar a la identificación y diagnóstico de estos trastornos raros (Mutch *et al.*, 2016).

Las mutaciones de los genes MAPs suelen causar errores evidentes en la migración neuronal (particularmente paquigiria y agiria), mientras que las anomalías de la vía axonal son más comunes en los pacientes con mutaciones de tubulina (Mutch *et al.*, 2016).

Tabla 11. Lista de genes de tubulina que producen tubulinopatías.

Secuencia de referencia de NCBI	Símbolo aprobado	Nombre aprobado	Cromosoma
NG_008966.1	TUBA1A	alfa tubulina1a	12q13.12
NG_042223.1	TUBB2A	beta tubulina 2A clase IIa	6p25.2
NG_016715.1	TUBB2B	beta tubulina 2B clase IIb	6p25.2
NG_027810.1	TUBB3	beta tubulina 3 clase III	16q24.3
NG_033886.1	TUBG1	gamma tubulina 1	17q21.31
NG_023429.1	TUBA8	alfa tubulina 8	22q11.21
NG_034142.1	TUBB	beta tubulina clase I	6p21.33
NG_051288.1	TUBA3E	alfa tubulina 3e	2q21.1
NG_033896.1	TUBB4A	beta tubulina 4A clase IVa	19p13.3

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Justificación

Las pruebas moleculares utilizadas para diagnóstico en los trastornos con desarrollo cortical son: los análisis con CMA, CGH, exoma filtrado por paneles personalizados, exoma clínico, exoma en tríos y secuenciación dirigida. Las pruebas del exoma y genoma completo proporcionan una oportunidad para la detección temprana e identificar riesgos genéticos que de otra manera no se sospechaban (Burke, 2014). La secuenciación de nueva generación (NGS) implementada para el diagnóstico genético puede proporcionar un gran número de variantes en las pruebas genéticas; se deben considerar los resultados potenciales: positivos, negativos, falsos positivos o indeterminados, de acuerdo al contexto patogénico (Parrini *et al.*, 2016, Burke, 2014). El uso de la PCR para amplificar genes específicos y evaluar el posible efecto patogénico en pacientes con fenotipo distinguible, es una herramienta rápida, ideal para el diagnóstico en uno o dos genes de interés.

Hipótesis

La estrategia molecular PCR multiplex diseñada para realizar diagnóstico dirigido a un solo gen o genes de tubulina, podría facilitar el diagnóstico genético en pacientes con fenotipo distinguible de otras tubulinopatías.

Objetivos

Objetivo general

- I. Proponer una estrategia para amplificar los genes de tubulinas involucrados en tubulinopatías.

Objetivo particular

- I. Diseñar *primers* específicos para cada gen que permita la amplificación diferencial de tamaño para cada amplicón.
- II. Diseñar *primer* degenerado en la subfamilia de tubulina sin comprometer la eficiencia de la PCR Multiplex.

Materiales y métodos

PCR Multiplex

La reacción en cadena de la polimerasa múltiplex (PCR) es una variante de la PCR en la que dos o más loci se amplifican simultáneamente en la misma reacción (Henegariu *et al.*, 1997). La técnica de PCR multiplex se ha implementado para la detección de mutaciones en el gen de la distrofia muscular de Duchenne (Chamberlain *et al.*, 1988), con el tiempo se han encontrado otras aplicaciones como la detección simultáneas de múltiples marcadores que contienen regiones polimórficas con aplicación en genética forense (Budowle *et al.*, 1995). La clave de esta técnica, está en el diseño de los primers de tal forma que generen amplicones de tamaño variable permitiendo la separación en un gel de agarosa o poliacrilamida sin presentar empalme (Zangenberg *et al.*, 1999). Además, esta técnica permite el ahorro de tiempo y costos, reduciendo la cantidad de tubos para la reacción y minimiza la posibilidad de contaminación (Zangenberg *et al.*, 1999).

PCR con *primer* degenerado (DOP-PCR)

DOP-PCR es una técnica rápida, eficiente e independiente de la especie para la amplificación general del ADN, su eficiencia se basa en utilizar una temperatura de alineación inicial baja garantizando el cebado de múltiples sitios y la degeneración de los *primers* (Carter *et al.*, 1992).

Datos de tubulinas

Las secuencias de referencia utilizadas fueron extraídas de la base de datos de NCBI y con el software online "Genome viewer map" se mapeo la región exogénica precisa para cada gen (Pruitt *et al.*, 2005, Thorvaldsdóttir *et al.*, 2013). En la siguiente tabla se resume los datos de las tubulinas estudiadas para el diseño de PCR Multiplex.

El caso particular del gen TUBB3 se encontró que codifica para la isoforma I y II, cerca de la secuencia de este gen se encuentra el gen del receptor a melanocortina 1 (MC1R) que codifica para el alfa-melanocito TUBB3 (NM_002386.3). Se sabe que la β -tubulina de clase III se expresa en melanocitos en humanos, *in vivo* e *in vitro* (Locher *et al.*, 2013), estos genes se encuentran muy cerca en el cromosoma y no se deben confundir. Además, no hay evidencia que respalde a una tubulinopatía debido a una mutación en la región de MC1R, al igual que en la base de datos de ClinVar, no hay ninguna mutación patogénica reportada, por lo que no se diseñaron primers en la región nucleotídica que corresponde a MC1R.

Método para el diseño de *primers* específicos

El diseño de *primers* específicos se realizó en Primer-Blast, conservando las mismas características expuestas en el apartado de MÉTODOS del Capítulo 1 y con una diferencia de temperatura de fusión no mayor a 2 °C entre los pares complementarios.

Método para el diseño de *primer* degenerado

El diseño del *primer* degenerado se realizó de forma manual para el último exón en la subfamilia de las beta-tubulinas, con ayuda del software Primer-Blast se confirmó la ausencia de amplicones no deseados, así como la complementariedad específica para cada gen.

Resultados

Diseño de *primers* específicos

Gamma tubulina

TUBG1

La secuencia del gen TUBG1 con el número de acceso NG_033886.1, posee 12 exones sombreados con color amarillo. Las regiones sombreadas de la secuencia con color rojo, verde, rosa o azul; corresponden a los pares de *primers* descritos en la (Tabla 12).

```
5221 catgaacgaa ggccagtgt taaagactg ccttcattg ccagaactcg attctcattg
5281 gagcggagga agttcgtggg tggagctggt tgtttggcgc ctgcgtcttg cggcgagcgg
5341 gctggcgtgc ggcgccgttg cggcgggag cggctgcaac gccggtgctt gaggagcgat
5401 gccgagggaa atcatcacc tacagttggg ccagtgcggc aatcagagtg agcgaaactc
5461 cggccctca gctagccagg ttccttaggg tcaatgggat ctgcctgtgg gatcctggac

5641 cagacacggg agagtcc tgc ggttgactt cttatccc tg gacgcaggcg cccagtcccc
5701 cggctcctga ttggaacctg cccggacctg gatattcttct ttctcccctg cccgccctt
5761 cccccagtt gggttcgagt tctggaaaca gctgtgcgcc gagcatggta tcagccccga
5821 gggcatcgtg gaggagtgc ccaccgagg cactgaccgc aaggacgtct ttttctacca
5881 ggtgccccca gcgacttggc cggggcgcc agttgcccc gggggcggaa ggggaaggag
5941 tggcctgta ctgggaacct cgtgggcag tagggccagg cgctggctt gaggaggag
6001 ggccggagg agccagagt gggaggactt cggacttggg ccgccctagc tgattggcc
6061 cctcctgga ctcccctga cag gcagacg atgagcacta catcccccg gccgtgctgc
6121 tggacttga acccgggtg atccactcca tctcaactc ccctatgac aagctctaca
6181 accagagaa catctacctg tcggaacatg gaggaggagc tggcaacaac tggccagcg
6241 gattctccca gtcgtttcc tattcctg cagggcc ac aactcgtgg gtagggacag

7681 gtcagagacc tccatggtt ctgtccact ctgacctcc cctatgtctg tacagggaga
7741 aaagatccat gaggacatt ttgacatcat agaccgggag gcagatggta gtgacagtct
7801 agagtaagt gtcccaggaa tgctggttag agccgacatg ggcaaggctt ggcagcacc
7861 tctagaagcg acctgttagg aacaagacct actcatgtac cctttgact ggacagaagc
7921 tatcaggcct tgccagaaac aaggcagttg cctaagctgt ataagtgagg ggactggatg
7981 ggaagcaagg gctcgggaaa atgggagtcc taaaaaacta tgagatgggt ctagtgtgac
8041 atcctgccac tagatacctg tacactgact gcccttccc catgcaggc tttgtgctgt
8101 gtcactccat tgctggggg acaggctctg gactgggttc ctaccttta gaacggctga
8161 atgacaggta agtttgtgtt tggggattag gaaaggtctc caacttgct tctaaatga
8221 ctaggggacc cagcagatat aactccatat ttgctggaac aggaaagagt tcttatattc
```

8521 ttatctgctt ctggacagtt gttagggagc gccatgttca ccaggccttc ggtctgttgc
8581 cctgatcctt tcccacacc ccaccaggtg tcctaagaag ctggtgcaga cataactcagt
8641 gtttcccaac caggacgaga tgagcgatgt ggtggtccag ccttacaatt cactcctcac
8701 actcaagagg ctgacgcaga atgcagactg tgtggtgagt cctggattct acctctcca
8761 actctcaaca cccatacc actcgagtct attaatcat tttcatgtat ttaaaaaaa
8821 tccatthtag ccagggtgcag tggctcatga ctgtaatccc atcactthtg gaggccaagg

9241 ctagggtcag gcagagctcc tgtttttctt atbccattg atctgtgatc ctcttctgtc
9301 ccccagggtg gtgctggaca acacagccct gaaccggatt gccacagacc gcctgcacat
9361 ccagaaccca tccttctccc agatcaacca gctggtgggc cccactcct ggactcctt
9421 ggacttgaag cctccttgt tggagggtca tttggggaag ggaggtcca ccaggctga
9481 ggccataac atggcacgcc tgtcccagg tgtctaccat catgtcagcc agcaccacca
9541 cctgcgcta cctggctac atgaacaatg acctcatcgg cctcatcgc tcgctcattc
9601 ccaccccacg gctccacttc ctcatgaccg gctacacccc tctcactacg gaccagtcag
9661 taagagcagc cttcagtgtc ccaggccagc ccggccctgg gcccaacagc cctgtccta
9721 gectttctct etteccc act gccccaggag ctaccctttg tggaccccaa ggcgcggcgc
9781 tcagggactg gcacagagt gggcactttc ttgctgactt gctctccacc ctccctctgc
9841 ctttggcttc tgccaaagag aagccaaagg gggactgtgc cctgagcgtc ggcgggtcc
9901 ctgtctcact gtcctatcag gtggccagcg tgaggaagac cacggtcctg gatgtcatga
9961 ggcggctgct gcagcccaag aacgtgatgg tgtccacagg ccgagaccgc cagaccaacc
10021 actgctacat cgccatcctc aacatcatcc agggagaggt ggaccccacc caggtagggg
10081 aggcccttc atcccacacc ctggacctgc aggggtagag gagagccac ctccactgct
10141 cctatgccc cccagggtcc acaagagctt gcagaggatc cgggaacgca agttggccaa
10201 cttcatcccg tggggcccgc ccagcatcca ggtggccctg tcgaggaagt ctccctacct
10261 gccctcggcc caccgggtca ggggctcat gatggccaac cacaccagca tctcctcggg
10321 gagtctcaaa gtttcacct ttttccctg aatcagtttc ctgactatac ctcacctctc
10381 tgcattctgct ggcctgctt ctagcttttt tgetgtgggc atagcccagc ctgggttccc
10441 cagctttctg ggccacgtta ttctttgaag ttctttgtaa cccctgttt ctgcacacc
10501 caagctcttc gagagaacct gtcgccagta tgacaagctg cgtaagcggg aggccttctt
10561 ggagcagttc cgcaaggagg acatgttcaa ggacaacttt gatgagatgg acacatccag
10621 qqagatttq caqaactca tcgatgagta ccatgcccgc acacggccag actacatctc
10681 ctggggcacc caggagcagt gactccccca ggacagggac cctcatctgc cttactgggt
10741 ggcccaagcc ctgctgact gaccacccc tcagagcaca gatcagggac ctcacgcatc

Tabla 12. Características de primers en TUBG1

Exones	Primers	Tamaño	Tm ()	GC%	Tamaño de amplicón	color
1	Primer Forward GTGGG TGGAGCTGGT TGTT	20 pb	60.76	55	213 pb	rojo
	Primer Revers AGAGCGAGATCCCATGACC	20 pb	59.82	55		
2 y 3	Primer Forward TGC GGCTTGACTT CTTATCCC	21 pb	60.41	52.38	639 pb	verde
	Primer Revers CCCTACCCAGCGAGTTGT	18 pb	58.61	61.11		
4 y 5	Primer Forward TCCCATGGTT CTGTCCCACT	20 pb	60.48	55	550 pb	rosa
	Primer Revers ATATCTGCTGGGTCCTAGT	21 pb	59.49	52.38		
6	Primer Forward TT GTTAGGGAGC GCCATGTT	21 pb	60.95	52.38	242 pb	azul
	Primer Revers GGGTATGGGGTGTGAGAGTGT	22 pb	60.62	54.55		
7, 8 y 9	Primer Forward CCCCATTG ATCTGTGATC CTCTT	24 pb	60.75	50	464 pb	verde
	Primer Revers GGGAAGAGAGAAAGGCTAGGACA	23 pb	61.14	52.17		
10 y 11	Primer Forward G GGCGACTTTC TTGCTGACTT	21 pb	61.15	52.38	586 pb	rojo
	Primer Revers ATGCAGAGAGGTGAGGTATAGTC	23 pb	58.85	47.83		
12	Primer Forward AGCTTCTG GGCCACGTTA T	20 pb	59.67	50	303 pb	rosa
	Primer Revers GGCCAACCAGTAAGGCAGAT	20 pb	60.03	55		

Beta tubulina

TUBB2A

La secuencia del gen TUBB2A con el número de acceso NG_042223.1, posee 4 exones sombreados con color amarillo. Las regiones sombreadas de la secuencia con colores: verde, azul o rosa; corresponden a los pares de *primers* descritos en la (Tabla 13).

```

4861 ccacacctcg caccgcgcc cggtcctccc tcgcggtgcc gcagtcccag ccgcaccgcc
4921 ccgcggcca cagcccgcc cgtcatgacg tcaccgggca gggcgggtcc cccgggtataa
4981 aagaccg agc tgggggggcg gcggcaggtc tctgcgcagc ccagcccgcc ggtccacgcc
5041 gcgcaccgct ccgagggcca gcgccaccg ctccgcagcc ggcaccatgc gcgagatcgt
5101 gcacatccag gcgggccagt gcggcaacca gatcggcgcc aaggtgggct caccgccag
5161 gaggggcccg gggttgggac cgagggtgcg ggctggggcc ggggcggggg ctggaggccg
5221 cggcgcccc gggctggcgg ggtggacat tccgcggcga ggccgcggg cggggtccgg
5281gaggctgcat gaccgccag gatgcccga gcgcgcagc tgtgtgtgct ttaaatcggg
5341 ggcctttcga tttccctggg acacagccct tctgcgggac gcggttggca ttcccctggg
5401 tgtatttgtc tcagaaactt gggtcggggg tacggtcata tttattgcgc tagcttcatg
5461 tgaatttaat ttgtatattt ttctctacgg tttgaatgaa aacatgcagt gtcactggac

6301 acaaaagccc ctgttccaag gacatgggag gaggacaagg ccatocttag tgacattcag
6361 gatgcagagc catggtgtgg ttcttttttc atttcagttt tgggaggtca tcagcgatga
6421 gcatgggata gacccacag gcagttacca tggagacagt gacttgcagc tggagagaat
6481 caacgtgtac tacaatgagg ctgctggtga gtagcgggat gtgtgtgccc aggaatcctt
6541 gctttccatg atgtgggaga tgaaacgtcc caggaacatg cacgtgacaa aggcattgctt

```

6601 cttgcatatt catttcaaat gccactgct ggaaaaacat gttttatggt ttcttaagat
 6661 tctgctgtg ttgccacggc taagcacact caggacctcc tttttcttaa aagcagaaaa
 6721 tctcctgttc tccttttgtc tcagatgctg gaattgaaatg ctgctgtgag tccctcccca
 6781 agcacaggcc tgagtcagtt cttatttctt gcaggtaaca aatatgtacc tggggccatc
 6841 ctggtggatc tggagcctgg caccatggac tctgtcaggt ctggaccctt cggccagatc
 6901 ttcagaccag acaacttcgt gttcgggtatg tagtcatgat cactgggaac tggccaaatg
 6961 acacaccttc ttctaacag cctgcaaaag cacagttctt agtgttcagt gccaaagtga

 7501 gaagagtatt caaaagagaa gaatctgccca gtctaagacc agtccctacct tctcctccat
 7561 agtcaaaaatg acagattttg aaattcctta tgttttagtg tctaattgctt actttccctc
 7621 tggcaggcca gagtggagcc gggaataact gggccaaggg ccaactacaca gagggagccg
 7681 agctgggtoga ctcggtcctg gatgtggtga ggaaggagtc agagagctgt gactgtctcc
 7741 agggcttcca gctgaccac tctctggggg gcggcacggg gtccgggatg ggcaccctgc
 7801 tcatcagcaa gatccgggaa gagtaccag accgcatcat gaacaccttc agcgtcatgc
 7861 cctcacccaa ggtgtcagac acggtggtgg agcctacaa cgccaccctc tctgtccacc
 7921 agctgggtga aaacacagat gaaacctact ccattgataa cgaggccctg tatgacatct
 7981 gcttccgcac cctgaagctg accaccccca cctacgggga cctcaaccac ctggtgtcgg
 8041 ccacatgag cggggtcacc acctgctgc gcttcccggg ccagctgaac gcagacctgc
 8101 gcaagctggc ggtgaacatg gtgcocttcc ctgcctgca cttcttcatg cccggcttcc
 8161 cggccctgac cagccggggc agccagcagt accggggcgt cagggtgcc gagtcacc
 8221 agcagatggt cgactccaag aacatgatgg ccgctgcga cccgcgccac ggccgctacc
 8281 tgacggtggc tgccatcttc cggggccgca tgtccatgaa ggaggtggac gacgagatgc
 8341 tcaactgtga gaacaagaac agcagctact tctgtggagt gatccccaac aacgtgaaga
 8401 cggcctgtg cgacatccc ccccgcgcc tgaagatgct ggccaccctc atcggcaaca
 8461 gcaaggccat ccaggagctg ttaagcgca tctccgagca gttcacggcc atgttccggc
 8521 gcaaggcctt cctgcaactg tacacgggcg agggcatgga cgagatggag ttcaccgagg
 8581 ccgagagcaa catgaacgac ctggtgtccg agtaccagca gtaccaggac gccacggccg
 8641 acgaacaagg ggagttogag gaggaggagg gcgaggacga ggcttaaaaa cttctcagat
 8701 caatcgtgca tcttagtga acttctggtg tctcaagca tgggtcttct acttgtaaac
 8761 tatggtgctc agttttgct ctgttagaaa ttcacactgt tgatgtaatg atgtggaact
 8821 cctctaaaaa ttacagtatt gtctgtgaag gtatctatac taataaaaaa gcattgtg tag
 8881 aaaaccttgt ggtctgtggt ctcaactcaa ataattttta ttcttctct aaatgcttaa
 8941 gtataaagtg tcaaggttta acttgctact gtttttattg tggtaatcaa agtttaattt
 9001 taatagcaat gtaggatttc tgottttagtg ttttaattaa taacattcct gtccttttag

Tabla 13. Características de primers en TUBB2A

Exones	Primers	Tamaño	Tm ()	GC%	Tamaño de amplicón	color
1	Primer Forward					
	GTCCCCGGGTATAAAAGACCG	21 pb	60.2	57.14	439 pb	verde
	Primer Revers					
2 y 3	ATACACCCAGGGGAATGCCA	20 pb	60.9	55		
	Primer Forward					
	G GAGGACAAGG CCATCCTTAG	21 pb	59.86	57.14	658 pb	rosa
4 parte I	Primer Revers					
	TGCAGGGCTGTAGGAAGAAG	21 pb	60	52.38		
	Primer Forward					
4 parte II	TGCCA GTCTAAGACC AGTCC	20 pb	58.73	55	719 pb	azul
	Primer Revers					
	TGTTCTTGGAGTCGAACATCTG	22 pb	58.35	45.45		
4 parte III	Primer Forward					
	CTTCTCATG CCCGGCTTCG	20 pb	61.71	60	607 pb	verde
	Primer Revers					
4 parte III	AAGACCATGCTGAGGACAACA	22 pb	60.16	45.45		
	Primer Forward					
	ACGAACAAGG GGAGTTCGAG	20 pb	59.68	55	390 pb	rosa
4 parte III	Primer Revers					
	CACTAAAGCAGAAATCCTACATGTC	25 pb	58.74	40		

TUBB2B

La secuencia del gen TUBB2B con el número de acceso NG_016715.1, posee 4 exones sombreados con color amarillo. Las regiones sombreadas de la secuencia con colores verde, azul o rosa; corresponden a los pares de *primers* descritos en la (Tabla 14).

```
4981 cgccagcgcg aaggggactg gggggctcgg gctgggggcg cggcctgtgc cggccgcccc
5041 acctccttg cataaaagcc ggagcccgcg gggccggcg tctcagcccg tcggttcccg
5101 agcgcttcc cgtgacccc gcagtgggtg tgtgagggga ggacggacag acccagacgc
5161 cgccggacca ggaggacgt gacgaggcac c atgcggtgag atcgtgcaca tccaggcggg
5221 ccagtgcggc aaccagatcg ggcccaaggt gggcgcgccg cagcggaggg ggtccaatgg
5281 gggcgcgaac ctgggcccag agcccctcgg ggtccccagg cgcggtcctg ggaaggcctg
5341 gggatcgcca aatgcagacc ttctggccc ctttgtgccc ccgagtgtgg cctgggctag

5941 acgcccttta aagcttcaag ctctgaaat gttgggttgt cggaaactgag tcggggacat
6001 ttcattgtga gccttggcgt tctgggggc atcgttcatg gctaaatgca gcctttctgt
6061 ctcagttttg qqaqatcacc aqtqatqaqc atqqqattqa ccccactqac agttaccatg
6121 gagacagtga tttgcagctg gagagaatca atgtttacta caatgaagcc actggtaatc
6181 acccttgccc c accccact cccttcagtt tttccacct ctccccttc ccttgcggtg
6241 gacccaggg gtgtggccct gggagagggt ggactattca gtttaggatc cccgctcttt
6301 cctgcagta tttcattggg cttccttatg caacagagc cctttgagaa cctgatggtg
6361 ggtctccctt tgtttggggc aacatctgca tgatggcagc aggcgccaag cccttctctg

6421 cagaggtcct tgccagagg tctaagtcac tgttgttcct tgcaggtaac aaatatgttc
6481 ctcgggccaat cctcgtggat ctggagccag gcacgatgga ttcgggttagg tctggaccat
6541 tcggccagat cttcagacca gacaatttcg tgtttgggtga gtgcctgggt tggctgagag
6601 catgagggat tcattttacg ctgggagctg gaggctgaag aggtgtgatt gccagagggg
6661 aagcatgaag aacatccgcg gtgtgccaac ttagctttaa tatagtgtaa aattgtttgc

6721 ctttcagctg ctaagagctt ggtgtcctgg cttccttat ttataattat attcatgaac
6781 aaatatttta acgtttgcc attttggtga taatctgaaa tagtcttacc tgagcattga
6841 ctcactgatc tatattgagg ggtttgaggt aaggtatta gtacaatcac cggtgactta
6901 agatttctct ttcctctgag caggccagag tggagccggg aataactggg ccaagggcca
6961 ctacacagag ggagccgagc tggctgactc ggtcctggat gtggtgagga aggagtcaga
7021 gagctgtgac tgtctccagg gcttccagct gacccactct ctggggggcg gcacggggctc
7081 cggatggggc accctgctca tcagcaagat ccgggaagag taccagacc gcatcatgaa
7141 caccttcagc gtcatgcct cacccaaggt gtcagacacg gtggtggagc cctacaacgc
7201 caccctctcg gtcaccagc tggtgaaaaa cacagatgaa acctactgca ttgacaacga
7261 ggcctgtat gacatctgct tccgaccct gaagctgacc acccccacct acggggacct
7321 caaccacctg gtgtcggcca ccatgagcgg ggtcaccacc tgctgcgct tcccgggcca
7381 gctgaacgca gacctgcgca agctggcggg gaacatgggt cccttcctc gcctgactt
7441 cttcatgccc ggcttcggc cctgaccag ccggggcagc cagcagtagc gggcgctcac
7501 ggtgcccag ctaaccagc agatgttcca ctccaagaac atgatggcgg cctgagacc
7561 gcgccacggc cgtacctga cggtggtgc catcttccgg ggccgcatgt ccatgaagga
7621 ggtggacgag cagatgctca acgtgcagaa caagaacagc agctacttcg tggagtggat
7681 cccaacaac gtgaagacgg cgtgtgcca catcccgcc cgcggcctga agatgtcggc
7741 caccttcacc ggcaacagca cggccatcca ggagctgttc aagcgcacct ccgagcagtt
7801 cacggccatg ttccggcgca agccttctct gactgggtac acggggcagag gcatggacga
7861 gatggagttc accgagggcg agagcaacat gaacgacctg gtgtccgagt accagcagta
7921 ccaggacgcc acggccgacg aacaagggga gttcagaggag gaggagggcg aggacagggc
7981 gtagatgcc ccgcgagacg ggttagggaa agcggaggag gaaagcagag ggggtggggg
8041 cttcccggga cgataacctg cagtggaag gaaagaagca tggctactt taggtgtgcg
```

Tabla 14. Características de primers en TUBB2B

Exones	Primers	Tamaño	Tm ()	GC%	Tamaño de amplicón	color
1	Primer Forward					
	CCTCCTTG CATAAAAGCC GGA	21 pb	60.68	52.38	323 pb	verde
	Primer Revers					
2	Primer Forward					
	ATTCATTGTGA GCCTTGGCG	21 pb	59.8	47.62	375 pb	azul
	Primer Revers					
3	Primer Forward					
	ACAAAGGGAGACCCACCATC	20 pb	59.3	55		
	Primer Revers					
4 parte I	Primer Forward					
	ACCCCCACT CCCTTCAGTT TTT	20 pb	60.7	55	557 pb	rosa
	Primer Revers					
4 parte II	Primer Forward					
	AGGACACCAAGCTCTAGCAG	21 pb	59.72	52.38		
	Primer Revers					
4 parte I	Primer Forward					
	TATTGAGG GGTTGAGGT AAGGT	23 pb	58.82	43.48	689 pb	verde
	Primer Revers					
4 parte II	Primer Forward					
	TGTTCTGGAGTCGAACATCTG	22 pb	58.35	45.45		
	Primer Revers					
4 parte II	Primer Forward					
	TCATGCCG GGCTTCGC	16 pb	60.15	68.75	627 pb	azul
	Primer Revers					
	TTCCACTGCCAGGTATCGT	20 pb	59.02	50		

TUBB3

La secuencia del gen TUBB3 con el número de acceso NG_027810.1, posee 4 exones sombreados con color amarillo. Las regiones sombreadas de la secuencia con colores verde, azul o rosa; corresponden a los pares de *primers* descritos en la Tabla 15. La región sombreada con gris corresponde a la secuencia del gen MC1R que codifica para el alfa-melanocito TUBB3.

```

2221 acgactcctt cctgcttctt ggacagagact atggctgtgc agggatccca gagaagactt
2281 ctgggctccc tcaactccac ccccacagcc atccccccagc tggggctggc tgccaaccag
2341 acaggagccc ggtgcttggg ggtgtccatc tctgacgggc tcttctctcag cctggggctg
2401 gtgagcttgg tggagaacgc gctggtggtg gccaccatcg ccaagaaccg gaacctgcac
2461 tcaccatgtt actgcttcat ctgctgectg gccttgtcgg acctgctggt gageggggagc
2521 aacgtgctgg agacggccgt catcctcctg ctggaggccg gtgactggtt ggcccgggct
2581 gcggtgctgc agcagctgga caatgtcatt gacgtgatca cctgcagctc catgtgtcc
2641 agcctctgct tctggggcgc catcgccgtg gaccgctaca tctccatctt ctacgcactg
2701 cgetaccaca gcatcgtgac cctgcccggg gcgcccggag ccggttgggc catctgggtg
2761 gccagtgtcg tcttcagcac gctcttcacg gctactacg accacgtggc cgtcctgctg
2821 tgccctgtgg tcttcttctt ggctatgctg gtgctcatgg ccgtgctgta cgtccacatg
2881 ctggcccggg cctgcccagca cgcccagggc atgcccggc tccacaagag gcagcggccc
2941 gtcaccaggg gctttggcct taaaggcgct gtcaccctca ccactctgct gggcattttc
3001 ttctctgctt gggcccctt ctctctgcat ctcaactca tegtctctg ccccagcac
3061 cccacgtgcg gctgcatctt caagaacttc aacctctttc tgcctctcat catctgcaat
3121 gccatcatcg acccctcat ctacgccttc cacagccagg agctccgag gacgtcaag
3181 gagtgctga catgctctg gtcggcggc tgcacgggc ttaagtgtg ctgggcagag
3241 ggaggtggtg atattgtgtg gtctggttcc tgtgtgacc tgggcagttc cttacctccc

6241 ggcggcgect cccgattggc caccgcgggt gacatcagcc gatgcaag gcggggccc
6301 ggctataaga gcgcgggccc gcggtecccc accctcagca gccagcccgg cccggcccgg
6361 ccgctccgca gccggcccgc agacgcgccc agt atgaggg agatcgtgca catccaggcc
6421 ggccagtgcg gcaaccagat cggggccaag gtgaggctgc gcgcccggc ctgtcccggg
6481 ccccggggcg ggaggagga ggcccgctgc cccggggccc gcacctcag ctgccccggc
6541 cctgccaac ctgcaacaaa ggatgcgccc cagcggccgc cggggggccc gggacgcggg

```


6601 gccccgccc tgggactctc gctgcacct ctctgccct gccaggtga cctcgggctg
15361cgtgtaggtg tggaggtgca tatttattat ggcaatthtc tgacaggtaa cagagtggtg
15421 ggctctcttc tgaatggggc tctgtggaggc cgtgggtcaa aagccctaat tttgtagtga
15481 gggctaaaag gcttcacaag ggaaggggc ttgctggggc tatgggcccg tgccgacccc
15541 ccctctocca ctttgtttgc agttctggga agtcatcagt gatgagcatg gcatcgacc
15601 cagcgcaac tacgtggggc actcggactt gcagctggag cggatcagcg tctactaaa
15661 cgaggcctct tgtgagtgc tgcaccagc tccctatccc agccctggac tgaccaggtc
15721 tcagcgtctg actgaccagg tctcagcacc tggactcacc agctctcagc atctctgtcc
15781 tccatgggt taggttggct gagatgccag caggcgtaac tggatgtcag gcatccagac
16381 gggcacagaa ttcagaaaga atgagggaga ggctctggcc ctctgtgacc cgaatcaccg
16441 agccctctc tccctcagc tcacaagtac gtgcctcgag ccattctggt ggacctggaa
16501 cccggaacca tggacagtgt ccgctcaggg gcctttggac atctcttcag gctgacaa
16561 ttcactcttg gtaagttccc cctgctcaa gctctgatg cagacccat cacaggcaag
16621 cccaggtcgg tggacgggga cgctgtgag aaacaaggaa tggtcagctc ctcacatgat
16681 cctgaatggt ggaactcat ctctccatt tacagctggg cattggaggc ccagagaaa
17641 tgggatgttc aggcaggggc tggaggtctg gactgcagag tccctggccc ctgtctctta
17701 cccctctctt cctgtacag gtcagagtgg ggcgggcaac aactgggcca agggctacta
17761 cacggagggg ggggagctgg tggattcggc cctggatgtg gtgcggaagg agtgtgaaaa
17821 ctgcactgc ctgcagggt tccagctgac cactcgtctg gggggcggca cgggctccgg
17881 catggcacg ttgctcatca gcaaggtgct tgaggagtat cccgaccgca tcatgaacac
17941 cttcagcgtc gtgcctcac ccaaggtgct agacacggct gtggagccct acaacgccac
18001 gctgtccatc caccagctgg tggagaacac gcatgagacc tactgcatcg acaacggagc
18061 gctctacgac atctgcttc gcacctcaa gctggccacg cccacctacg gggacctcaa
18121 ccacctggtc tggccacca tgagcggagt caccacctcc ttgcgcttc cgggccagct
18181 caacgctgac ctgcgcaagc tggcctcaa catggtgccc tcccgcgccc tgc acttctt
18241 catgcccggc ttgcccccc tcacagccc gggcagccag cagtaccggg cctgaccgt
18301 gcccagctc acccagcaga tgttogatgc caagaacatg atggccgccc gcgaccgccc
18361 ccacggccc tacctgacgg tggccacctg gttccggggc cgcatttcca tgaaggaggt
18421 ggacgagcag atgctggcca tccagagcaa gaacagcagc tacttctggt agtggatccc
18481 caacaacgtg aagtgggccg tgtgtgacat cccgccccgc ggcctcaaga tgtcctccac
18541 cttcatcggg aacagcacgg ccatccagga gctgttcaag cgcattctcc agcagttcac
18601 ggcatgttc cggcgaagg ccttctgca ctggtacac ggcgagggca tggacgagat
18661 ggagttcacc gaggccgaga gcaacatgaa cgacctggtg tccgagtacc agcagttaca
18721 ggacgccacg gccgaggaag agggcgagat gtacgaagac gacgaggagg agtcggaggc
18781 ccaggcccc aagtcagct gctcgcagct ggagtgagag gcaggtggcg gccggggccc
18841 agccagcag tgtctaaacc ccggagcca tcttctgccc gacacctgc tttcccctgc

Tabla 15. Características de primers en TUBB3

Exones	Primers	Tamaño	Tm ()	GC%	Tamaño de amplicón	color
1	Primer Forward					
	GGGCCGCGGCTATAAGA G	18 pb	60.05	66.57	268 pb	verde
	Primer Revers					
	CTTTGTGCAGGTCGCAGG	20 pb	60.32	55		
2	Primer Forward					
	CTCTCTC TGAATGGGGC TCG	21 pb	60.2	57.14	407 pb	rosa
	Primer Revers					
	TGACATCCAGTTACGCCTGC	20 pb	60.39	55		
3	Primer Forward					
	TCAGAAAGA ATGAGGGAGA GGCT	23 pb	60.82	47.83	330 pb	azul
	Primer Revers					
	GCCCAGCTGTAATGGAGAG	21 pb	58.98	52.38		
4 parte I	Primer Forward					
	CCC CTGCTCTTACCCCTCTTC	22 pb	61.22	59.09	651 pb	verde
	Primer Revers					
	TGTTCTGGCATCGAACATCTG	22 pb	59.26	45.45		
4 parte II	Primer Forward					
	ACTTCTTCATGCCCGGC TTC	20 pb	60.68	55	628 pb	rosa
	Primer Revers					
	GGGTTAGACTGCTGGCT	20 pb	59.96	55		

El conjunto de *primers* del exón 4 parte II de TUBB3 podría generar amplicónes no deseados con tamaños de 27 pb, 154 pb y 1105 pb, con una diferencia mayor de 50 pb por lo que no interfiere en la amplificación del gen (Figura 35).

>[XM_011521048.2](#) PREDICTED: Homo sapiens collagen type IV alpha 1 chain (COL4A1), transcript variant X1, mRNA

```
product length = 27
Forward primer 1 ACTTCTTCATGCCCGGCTTC 20
Template 394 T....GG.C.....G 413

Forward primer 1 ACTTCTTCATGCCCGGCTTC 20
Template 420 G.....A...G...G.. 401
```

>[XM_017021984.1](#) PREDICTED: Homo sapiens ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 17 (ADAMTS17), transcript variant X17, mRNA

```
product length = 1105
Reverse primer 1 GGGTTTAGACTGCTGGCT 20
Template 8780 ...CC.CCT..... 8761

Reverse primer 1 GGGTTTAGACTGCTGGCT 20
Template 7676 A.C..C..G.....A. 7695
```

>[NM_001034842.3](#) Homo sapiens patched domain containing 3 (PTCHD3), mRNA

```
product length = 154
Forward primer 1 ACTTCTTCATGCCCGGCTTC 20
Template 999 C.C...A.C..A..... 1018

Reverse primer 1 GGGTTTAGACTGCTGGCT 20
Template 1152 T..G.G..C.....T... 1133
```

Figura 35. Amplicónes no deseado para TUBB3. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primerblast.cgi?ctg_time=1562865028&job_key=PCS-3LV2kElpRSYjCXNYBCR9SRM7ZEw

TUBB (beta tubulina clase I)

La secuencia del gen TUBB con el número de acceso NCBI: NG_034142.1, posee 4 exones sombreados con color amarillo. Las regiones sombreadas de la secuencia con colores verde, azul o rosa; corresponden a los pares de *primers* descritos en la (Tabla 16).

```
5161 ccttcctgcc gtcgcgtttg cacctcgtg ctccagcctc tggggcgcac tccaaccttc
5221 cagcctgcga cctgcggaga aaaaaaatta cttattttct tgccccatac ataccttgag
5281 gcgagc aaaa aaattaaatt ttaaccatga gggaaatcgt gcacatccag gctggtcagt
5341 gtggcaacca gatcgggtgcc aaggtaagaa ttttacacct cttttatttc tttttacaag
5401 gaaaaatcca ggtaagttat gaaaaaagg ttgtggggca ttgcaac cgc ctatccttaa

7201 cactgcact ccagcctggt gacagagcga gactccgtct caaaaaaat taagaaaaag
7261 atgaaataaa atggtagttg gggacatagt tggctgggac ttgacctgtt gtgggtctcgt
7321 tgcctcccct cggcagttct gggaggtgat cagtgatgaa catggcatcg acccccacgg
7381 cacctaccac ggggacagcg acctgcagct ggaccgcac tctgtgtact acaatgaagc
7441 cacagtaag ggcaggagcc cggcagctc aggttccctt cctgtctcc cacttatctg
7501 ggatctcttt ccatttctgg gcacgcctta tcccctttgg gtgaatctgt cattttgtcc
7561 ctttctgtaa ccaccgtcgg ggccaaagac gtctgtctgc acctggtggc gggaccctga
7621 atgacaagtc tctgatccct gctgtctccc atttcagta tatctataaa ccttcccttc
7681tgccagattt cacagctott aactttattc tctgtagggt gcaaatatgt tctcctgtgcc
7741 atcctggtgg atctagaacc tgggaccatg gactctgttc gctcaggctc ttttggccag
7801 atcttagac cagacaactt tgtatttggg gagttataca gatgatatta gcagatgata
7861 taccatcgtg ttcaacttat ttgggtgcaa ggacacagca aaagttagga gatgattggt

8101 tabcctgtta attgagcttt tctcctgact gcattccagg tcagtctggg gcaggtaaaca
8161actgggccaa aggcactac acagagggcg ccgagctggt tgattctgtc ctggatgtgg
8221 tacggaagga ggcagagagc tgtgactgcc tgcagggctt ccagctgacc cactcactgg
8281 gcgggggcac aggtcttgga atgggcactc tctttatcag caagatccga gaagaatacc
8341 ctgatcgcac catgaatacc ttcagtgtgg tgcttcacc caaagtgtct gacaccgtgg
8401 tgcagcccta caatgccacc ctctccgtcc atcagttggt agagaatact gatgagacct
8461 attgcattga caacgagggc ctctatgata tctgcttccg cactctgaag ctgaccacac
8521 caacctacgg gatctgaac cacctgtct cagccacct gagtgggtgc accacctgcc
8581 tccgtttccc tggccagctc aatgctgacc tccgcaagtt ggcagtcaac atggtccct
8641 tcccacgtct ccatttcttt atgctctggt ttgcccctct caccagccgt ggaagccagc
8701 agtatcgagc tctcacagtg ccggaactca cccagcaggt cttogatgcc aagaacatga
8761 tggctgcctg tgacccccgc cacggccgat acctcaccgt ggctgctgtc tccctggctc
8821 ggatgtccat gaaggaggtc gatgagcaga tgcttaacct gcagaacaag aacagcagct
8881 actttgtgga atggatcccc aacaatgtca agacagccgt ctgtgacac ccacctcgtg
8941 gcctcaagat ggcagtcacc ttcattggca atagcacagc catccaggag ctottcaagc
9001 gcatctcgga gcagttcact gccatgttcc gccggaaggc ctctctccac tggtaacacg
9061 gcgagggcat ggacgagatg gagttcaccg aggctgagag caacatgaac gacctcgtct
9121 ctgagtatca gcagtaccag gatgccaccg cagaagagga ggaggatttc ggtgaggagg
9181 ccgaagagga ggccatggc agagccccca taccctcagg cttctcagttcc cttagccg
```

Tabla 16. Características de primers en TUBB

Exones	Primers	Tamaño	Tm ()	GC%	Tamaño de amplicón	color
1	Primer Forward					
	CCATAC ATACCTTGAG GCGAGC	22	60.87	54.55	183	verde
	Primer Revers					
2 Y 3	GTGCAAATGCCCCACAACCA	20	62.04	55		
	Primer Forward					
	GCTGGGAC TTGACCTGTT GT	20	60.18	55	613	azul
4 parte I	Primer Revers					
	ACTTTTGCTGTGTCCTTGAC	21	59.87	47.62		
	Primer Forward					
4 parte II	CCCTGTTA ATTGAGCTTT TCTCCTG	25	60.11	44	670	rosa
	Primer Revers					
	CACAGGCAGCCATCATGTTC	20	59.55	55		
4 parte II	Primer Forward					
	GTATCGAGC TCTCACAGTG CC	21	60.54	57.14	528	azul
	Primer Revers					
	ACTGAGAAGCCTGAGGTGATG	21	59.45	52.38		

Alfa tubulina

La organización de los exones en la familia de las alfa-tubulinas, tiene la característica particular de tener el codón de inicio ATG separado del primer exón. El codón de inicio se resaltó en color rosa en todas las secuencias. No existen mutaciones en el codón de inicio (ATG) reportadas en la base de datos de ClinVar. Una mutación en este codón generaría la pérdida de función de la proteína. Probablemente, estos genes son intolerantes a las mutaciones de pérdida de función, como también lo sugiere la observación en la base de datos ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>); las tubulinas tienen una probabilidad de intolerancia a la pérdida de función cercana a 1.00, valor consistente con una intolerancia casi completa (Parrini *et al.*, 2016).

TUBA1A

La secuencia del gen TUBA1A con el número de acceso NCBI: NG_008966.1, posee 3 exones sombreados con color amarillo. Las regiones sombreadas de la secuencia con colores verde, azul o rosa; corresponden a los pares de primers descritos en la (Tabla 17).

```

5041 aagcaacaac ctctcctctt cgtctccgcc atcagctcgg cagtcgcgaa gcagcaacca
5101 tggtgagaat cggcttcggc tctttgtggc cgttgggtgg agtcagcgc cccaggctct
5161 acttggaaaa cctttaagct cttttcttcc gtaagctctc tggggcaggg tgggtggtatg

6961 atacttttta aatatgaaaa atcttctatt caagcatggt agtaggcaca atgggctggt
7021 accacgtgct gaacagggcc aaggcgacat cattattcag accacacca tatgcagcat
7081 ttgtagcagg tgattttcct taatctttgt atcgtgctgg ggatagacc tcaataatt
7141 tagaaaaata tctgtatatt attagaata tttttgaaat ttcctataag tttgaaatgc
7201 taatacacct taattttacg attttttccac ttttctccc cacagcgtga gtgcatctcc
7261 atccacgctg gccaggctgg tgtccagatt ggcaatgcct gctgggagct ctactgctg

```

7321 gaacacggca tccagccga tggccagatg ccaagtgaca agaccattgg gggaggagat
 7381 gattccttca acaccttctt cagtgagacg ggggctggca agcatgtgcc ccgggagtg
 7441 tttgtagact tggaaaccac agtcattggt gagttgacct cagtaacca agtgagatcc
 7501 caggggtgctg ggacaggagg tctgtcctgg ggggctccgc tggtcactca cccactctcc

 7561 ctccccgctc ctctgcccctc ctctctctcc ccctctctcc tccccatca tgtttctccag
 7621 atgaagttcg cactggcacc taccgccage tcttccacc tgagcaactt atcacaggca
 7681 aagaagatgc tgccaataac tatgcccgag ggactacac cattggcaag gagatcattg
 7741 acctcggtgtt ggaccgaatt cgcaagctgg tatgtttctt ttcaagaata aagtaatta
 7801 atgagcctaa agaacacatt tgaataatg cttttttttt caaacacaga attgaactgt
 7861 tattttaata aagagtggaa tgagtcattc ttttggggtt ttaaaattc agttaaattg
 7921 aactatttga tgtcattttg taaatgttaa tgagaatfff ttaaaaagca tttgtcaaaa
 7981 taagatctaa gtcctggaag atgtatgaaa agtgaaata tattactat gattgtacta
 8041 caaagaataa aaacttaacc ttctctctgt tctctctctt tgttatagc cgaccagtgc
 8101 acgggtctcc agggcttctt ggttttccac agctttgggtg ggggaactgg ttctgggttc
 8161 acctcgctgc tcatggaacg tctctcagtt gattatggca agaagtccaa gctggagttc
 8221 tctatttacc cggcgcccca ggtttccaca gctgtagttg agccctacaa ctccatcctc
 8281 accaccacaca ccaccctgga gcactctgat tgtgccttca tggtagacaa tgaggccatc
 8341 tatgacatct gtcgtagaaa cctcgatatt gagegtccaa cctatactaa cctgaatagg
 8401 ttaataggtc aaattgtgtc ctccatcact gcttccctga gatttgatgg agccctgaat
 8461 gttgacctga cagaattcca gaccaactg gtgccctatc cccgcatcca ctccctctg
 8521 gccacatatg ccctgtcat ctctgctgag aaagcctacc atgaacagct ttctgtagca
 8581 gagatcacca atgcttgctt tgagccagcc aaccagatgg tgaaatgtga ccctcgccat
 8641 ggtaaatata tggcttgctg cctggtgtac cgtggtgacg tggttcccaa agatgtcaat
 8701 gctgcaattg ccaccatcaa gaccaagcgt accatccagt ttgtggattg gtgcccact
 8761 ggettcaagg ttggcatcaa ctaccagctc ccaactgtgg tgctgggtgg agacctggcc
 8821 aaggtacaga gagctgtgtg catgctgagc aacaccacag ccattgctga ggctgggct
 8881 cgctgggacc acaagtttga cctgatgtat gccaaactg cctttgttca ctggtagctt
 8941 ggggagggga tggaggaagg tgagttttca gaggccctg aggacatggc tgccttgag
 9001 aaggattatg aggaggttg tgtggattct gtgaaggag aggggtgagga agaaggagag
 9061 gaatactaaa gttaaaa cgt cacaaggtg ctgctttttac aggggaagctt attctgtttt

Tabla 17. Características de primers en TUBA1A.

Exones	Primers	Tamaño	Tm ()	GC%	Tamaño de amplicón	color
1	Primer Forward GTAGGCACA ATGGGCTGGTA	20 pb	59.75	55	508 pb	verde
	Primer Revers AGCACCTGGGATCTCACTT	20 pb	60.55	55		
2	Primer Forward GGT GAGTIGACCT CAGTAACCC	22 pb	60.29	54.55	685 pb	rosa
	Primer Revers AACCAGTCCCCACCAAAG	20 pb	60.11	55		
3 parte I	Primer Forward ACTTAACC TTCCTCTGT TCCTCT	24 pb	59.09	41.67	745 pb	azul
	Primer Revers CAGTGGGAGGCTGGTAGTTG	20 pb	60.04	60		
3 parte II	Primer Forward TGCCATTG CCACCATCAA GA	20 pb	60.25	50	396 pb	verde
	Primer Revers AAAAGCAGCACCTTGTGACG	21 pb	60.2	47.62		

El exón 3 parte II del gen TUBA1A genera amplicónes no deseado de 41 pb para CDH11, el tamaño del amplicón es pequeño comparado con los demás amplicónes por lo que no interferirá al realizar la electroforesis en gel de agarosa (Figura 36).

>[NM_001797.4](#) Homo sapiens cadherin 11 (CDH11), transcript variant 1, mRNA

```
product length = 41
Forward primer 1 TGCCATTGCCACCATCAAGA 20
Template 2509 ..AT.....C..C... 2528

Forward primer 1 TGCCATTGCCACCATCAAGA 20
Template 2549 AT.....AT.....G.. 2530
```

>[XM_005255763.3](#) PREDICTED: Homo sapiens cadherin 11 (CDH11), transcript variant X3, mRNA

```
product length = 41
Forward primer 1 TGCCATTGCCACCATCAAGA 20
Template 2384 ..AT.....C..C... 2403

Forward primer 1 TGCCATTGCCACCATCAAGA 20
Template 2424 AT.....AT.....G.. 2405
```

>[XM_024450134.1](#) PREDICTED: Homo sapiens cadherin 11 (CDH11), transcript variant X1, mRNA

```
product length = 41
Forward primer 1 TGCCATTGCCACCATCAAGA 20
Template 2525 ..AT.....C..C... 2544

Forward primer 1 TGCCATTGCCACCATCAAGA 20
Template 2565 AT.....AT.....G.. 2546
```

>[NM_001330576.1](#) Homo sapiens cadherin 11 (CDH11), transcript variant 3, mRNA

```
product length = 41
Forward primer 1 TGCCATTGCCACCATCAAGA 20
Template 2183 ..AT.....C..C... 2202

Forward primer 1 TGCCATTGCCACCATCAAGA 20
Template 2223 AT.....AT.....G.. 2204
```

Figura 36. Amplicónes no deseados en TUBA1A. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1562863216&job_key=189V3F52e0LCRc0j4nOzBM99ohPQZKc

TUBA8

La secuencia del gen TUBA8 con el número de acceso NCBI: NG_023429.1, posee 4 exones sombreados con color amarillo. Las regiones sombreadas de la secuencia con colores verde, azul o rosa; corresponden a los pares de primers descritos en la (Tabla 18).

```
5101 cggcggagge ggctgtatct ggagcagtcg gggcgggcag gccagctga gaggtgcgcg
5161 ggcgaggaca gcggcagcga tggtgaggct tcccggggcc aggcgggctg cgggcgcgcg
5221 gcaggcgtag gaccgagagc cgagtctacg cggaggcgca cggaccctgc ttctggagc

15721 gttatgggga tgtagggcaa aggcattgctg ggggccaga ctctctgacc tcgttgcttc
15781 cctctcccca cagcgggaat gcataatcagt ccacgtgggc caagcgggag ttcagattgg
15841 caatgcctgc tgggagctct tctgcctgga acacggcatc caggcagacg gcacttttga
15901 tgetcaagct agcaagatca acgatgatga ctctctcacc acctttttca gcgagactgg
15961 caatgggaag catgtgcccc gggcggctcat gatagatctg gacgctactg tagtgggtga
16021 gtgggggocg agttcccctc cacagagaac atctcgaaac tgcagaggcat tggcccaca
16081 gtagctaagg aagcagcgtc tctagctgga aggtggggat ggtgcaaccg cagcctccca

18361 ccatggagtt ttataggtag gggagaacg aagggg tcct gcggtagtgt ggtagggagg
18421 gaggcttctc cctgggcag taggacctaa tggctctctc ctcttgggaag atgaggttcg
18481 ggcaggaacc taccgccagc tcttccatcc agagcagctg atcacaggaa aggaggatgc
```

18541 agccaacaac tatgcccggg gccactacac ggtgggcaag gagagcattg acctgggtgct
 18601 ggaccgcata cggaagctgg taagatcagg agggcagggg acgggtgggt caggctggag
 18661 tggacaggct tggcccatg cctctttgat caggctaggg agaggcatdt gaccctggc

 20461 gagtcaactgt gcttgcccc atcccatatt ttagccactc ctccaagat caatacaact
 20521 ccttttgttt ccttacttct tcaaagctgt tttgatttca tccacaaaa aatatgaggc
 20581 agacagagtg ggcggtctgg cttttttact gtgggggtgtt ctcggaaact tgtcttcatg
 20641 atttcttctc atgtcctgct ctccctagac agatgcttgc tctggcctgc agggcttctc
 20701 gattttccac agttttggtg ggggcactgg ctccggcttc acttctctgc tgatggaacg
 20761 cctctccctg gattatggca agaaatccaa gctggagttt gccatctacc cagcccccca
 20821 ggtctctact gcagtgggtg agccctacaa ctccatcctg accaccaca ccacactgga
 20881 acattcagat tgtgcttca tggtgacaa cgaagccatc tatgacatct gccgcaggaa
 20941 ccttgacatt gagcgccta cctataccaa cctcaaccgc ctcatcagtc agattgtgtc
 21001 ctcaatcact gcttctctcc gctttgacgg ggccctcaat gtggacctca ctgagttcca
 21061 gaccaacctg gtgccctacc cccgatcca ctcccgctg gtcacctacg cgccatcat
 21121 ctctgcccag aaagcctatc acgaacagct ctctgtggcc gagataacca gctcctgctt
 21181 tgagcccaac agccagatgg tgaagtgcga cccgagacat ggcaagta ca tggcctgctg
 21241 catgctctac cggggcgacg tggtgcccaa ggatgtgaat gtcgctattg ctgccatcaa
 21301 gaccaagagg accatccagt ttgtagactg gtgtcccaca ggcttcaag tgagagctga
 21361 tgacttagga aggggagaga ggactagaga agcagagggga ggtgaccaag gatatgcaat

 25021 tgcattccat agcccactc ccacgcccct gaccatgact tgaagccatg ccaagtgacc
 25081 aagatgtccc atcctgagtt atcctctggc tgacttgtat cttcttctgt ggctcctcct
 25141 cttctgtgtt cctcagggtg ggcatacaact accagccccc gaccgtggtc cccggggggag
 25201 acctggccaa ggtgcagcgg gcgctctgca tgctcagcaa caccacggcc attgctggag
 25261 cctgggcccg cctcgaccac aagttcgacc tcatgtacgc caagcgggcc tttgtgcatt
 25321 ggtatgtggg agaggggatg gaagaaggag aattttctga ggccagggaa gacttagctg
 25381 ccttgaqaa ggattatgaa gaagtgggga ctgattcgtt tgaagaagaa aatgaagggg
 25441 aggaatttta a atatatacc ttcccctgg ctgtgtctct ttatttatgc tggccattc
 25501 aaagccatg ttcaagagaa cagaacactc tcccgcgcc agcctgatct ctgccttacc

Tabla 18. Características de primers en TUBA8

Exones	Primers	Tamaño	Tm ()	GC%	Tamaño de amplicón	color
1	Primer Forward A CTCTCTGACC TCGTGC	21 pb	59.73	52.38	292 pb	verde
	Primer Revers TGTTCTCTGTGGAGGGAACT	21 pb	60.41	52.38		
2	Primer Forward TCCT GCGGTAGTGT GGTAGG	20 pb	60.97	60	313 pb	rosa
	Primer Revers GATGCCTCTCCCTAGCCTGA	20 pb	60.47	60		
3 parte I	Primer Forward TFACT GTGGGGTGT CTCGG	20 pb	59.32	55	623 pb	azul
	Primer Revers TACTGCCATGTCTCGGGTC	20 pb	59.46	55		
3 parte II	Primer Forward GAG AAAGCCTATC ACGAACAGC	22 pb	59.39	50	261 pb	verde
	Primer Revers TCTAGTCCTCTCCCCCTCCT	22 pb	60.57	54.55		
4	Primer Forward GTAT CTCTCTGT GGCTCCTCC	23 pb	60.18	52.17	399 pb	rosa
	Primer Revers TTGAACATGTCTTGAATGGCA	23 pb	60.18	39.12		

TUBA3E

La secuencia del gen TUBA3E con el número de acceso NCBI: NG_051288.1, no coincide

con las regiones exogénicas señaladas en el “viewer map” por lo tanto en el exón 3 de TUBA3E el área está sombreada y también subrayada, ya que se desconoce la limitación precisa del exón.

La TUBA3E posee 4 exones sombreados con color amarillo. Las regiones sombreadas de la secuencia con colores verde, azul o rosa; corresponden a los pares de primers descritos en la (Tabla 19).

```

5041 gcagctgtgg cagccggttg aggtctggaa gtacgcttgg gctgaagcag cggagtctgc
5101 catggtgaaga cccgggtcac tcccgcctcg cagatgccca ggcagacgaa gttggcctcg
5161 ggtggacaga gggacgttgt tgcgggcctg ggcgctgaga ggaggccaga gaaggacgca

6961 aggaaatatac gattgtgaaa gcgccagata ctgaagcact atataaatat taaattagaa
7021 tattttgcat gccatatagt ttcaagttgc cttgaaatga atgggttcac atttatgttc
7081 cggttcacag cgcgagtgta tctctatcca cgtggggcag cggggtgtcc agatcggcaa
7141 tgctgtctgg gaactgtact gccttgaaca tggaaattcag cccgatgttc aaatgccaa
7201 tgataaaacc attggtggcg gggacgactc cttcaacacg ttcttcagt agactggagc
7261 tggcaagcac gtgccagag cagtgtttgt ggacctggag cccactgtgg tggtaggtg
7321 cctgggcact ggatggcagc ttctctgaga ggtggggaga gacattgtaa agccccgtgt

8161 aacactcctg gaatgtgtcc atcttgggta gtacaggcct taaaattca cagtacacac
8221 tgtctctttt gcagatgaag tgcgcacag gacctacag cagctcttcc acccagagca
8281 gctgatcacc gggaaggaag atgcagccag taattacgcc aggggccatt acaccatcgg
8341 caaggagatt gttgacctag tcttgaccg gatccgcaa ctggtgaaga gagaaggttt
8401 catgtggcca ttgtcttgca tgggaggggt agttcttga atgtgaaagg gaagtcattt

8941 aggttgggtg tgtggcttcc acgggcattg gctcacttg tctggtttct ctacagcggga
900: tctgtgcac ggactgcagc gcttctcat cttccacagc tttgggggc gactggctc
906: tgggttcgc tctctgctca tggagcggct ctcagtggat tacagcaag agtccaagct
912: agagtttgc atttaccac cccccaggt cttccacagcc gtgggtggag cctacaactc
918: catcctaac acccacagc cctggaac ttctgactgt gccttcagc tgcacaatga
924: agccatcta gacatatgt gcgcaacct ggacattgaa cgtcccacg acaccaacct
930: caatcgctt attgggcagc tctgtctct catcacggcc tccctgcga ttgatggggc
936: cctgaatgt gacttgacgc aattccagac caacctcgtg ccgtacccc gcatccactt
942: cccctggc acctacgcc cagtcactc agctgagaag gctaccac agcagctgtc
948: tgtggccga atcaccaat cctgcttgc gccagccaat cagatgttc agtgtgacc
954: tgcctatgg aagtacatg cctgctgcat gttgtacagg ggggacgtg tcccaaaga
960: cgtcaatgc gccatcgcc caatcaagac caagcgcact atccagttt tggattgggt
9661 cccgactgga ttaaggtat gactgggtga catggaggcc tttcagcaag cagcagatgc

11161 cctcgtctgg aactatcacc ctgcctggtg cagagaagg cttagtacg tttgtgaggt
11221 gaactgaGCA TTCTCCGTGT CACTACAagg gtgtctctg tttgaggaga agtagctacc
11281 atttctaggt ttgatataag cttcaaggac tgccttctt ccttctctg gcaggtgggc
11341 attactacc agccccac agtggctccc gggggagacc tggccaaggt gcagcgggccc
11401 gtgtgcatgc tgagcaacac cacggccatt gcggaggcct gggcccgcct ggtccataag
11461 ttcgatctca tgtatgcaa gtggccttt gtgactggt acgtgggcga aggcattgaa
11521 qaqqqaqat tetctgaqc ccqcaqqac ctqcaqctc taqaqaaga ttgtgaagag
11581 gtggcggtg attcctgga agctgaggct gaagaaggcg aagaatac tga ggggaggt
11641 gtgggtggtt ctcccctgcc acccctaga tggctgctt caagttgtt gcaattaaag

```


Tabla 19. Características de primers en TUBA3E

Exones	Primers	Tamaño	Tm ()	GC%	Tamaño de amplicón	color
1	Primer Forward					
	AGTTGC CTGAAATGA ATGGGT	22 pb	58.76	40.91	317 pb	verde
	Primer Revers					
	CTCTCCCACCCTCTCAGGAA	20 pb	59.96	60		
2	Primer Forward					
	TCC ATCTTGGTGA GTACAGGC	21 pb	59.44	52.38	252 pb	rosa
	Primer Revers					
	CCCCTCCCATGCAAGACAAT	20 pb	60.03	55		
3	Primer Forward					
	GCATTG GCTCACGTTG TCTG	20 pb	60.11	55	745 pb	azul
	Primer Revers					
	TTGCTGAAAGGCCTCCATGT	20 pb	59.89	50		
4	Primer Forward					
	GCA TTCTCCGTGT CACCTACA	21 pb	60.07	52.38	462 pb	verde
	Primer Revers					
	AACAACCTGAAAGCAGCCATCC	22 pb	59.96	45.45		

Diseño de *Primer* degenerado

El *primer* degenerado posee nucleótidos variables, dependiendo de la combinación se le asigna una letra a la posición variable de acuerdo con el código establecido (Figura 37). Se logró diseñar un *primer* degenerado en la región exónica de los genes TUBB2A, TUBB2B y TUBB3 de la familia beta-tubulina. Esta región exónica es muy conservada, lo que hace posible el uso del *primer* para amplificar a los tres genes (Figura 37).

B	D	H	K	M	N	R	S	V	W	Y
C/G/T	A/G/T	A/C/T	G/T	A/C	A/C/G/T	A/G	G/C	A/C/G	A/T	C/T

Figura 37. Código para primers degenerados. Extraído de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html#/legacy=www.thermoscientificbio.com>

Alineando en MUSCLE las secuencias de los genes TUBB2A, TUBB2B y TUBB3 en la región del *primer* degenerado se obtiene la variación en el nucleótido C/T que corresponde a la letra Y, y la variación G/T que corresponde a la letra K (Figura 38).

resultados varían debido al termociclador se debe ajustar el número de ciclos (Figura 40) (Henegariu *et al.*, 1997). También pueden presentarse otras dificultades en la PCR Multiplex debido a la concentración de primers, concentración del cloruro de magnesio, número de ciclos etc., sin embargo, se han publicado manuales y documentos que proveen estrategias para solucionarlos entre ellas: “multiplex pcr: optimization guidelines” (Zangenberg *et al.*, 1999) y “Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol” (Henegariu *et al.*, 1997).

Cuando la reacción multiplex se realiza por primera vez, se recomienda agregar los primers en cantidades equimolares (Henegariu *et al.*, 1997). Las proporciones de los componentes van a estar determinadas por el protocolo de la ADN polimerasa que se vaya a utilizar. A partir de las proporciones establecidas, se varía la concentración de los primers, Mg²⁺ y aditivos. Debe tomarse en cuenta que la competición por suministros ocurre de forma simultánea en todos los *loci* amplificados. Se ha demostrado que el BSA no presenta efecto inhibitorio en la amplificación de *loci*. Mientras tanto el DMSO al 5% presenta incremento en la eficiencia, pero con efecto inhibitorio en algunos *loci*. Se recomienda el uso de BSA con una concentración de hasta 0.8 mg/mL para incrementa la eficiencia de la reacción obteniendo un mejor resultado que el DMSO o glicerol (Henegariu *et al.*, 1997).

Program A	
First Denaturing	94°C, 4 min
Denature	94°C, 30 s
Anneal	54°-56°C, 30 s*
Extend	65°C, 1 min
	32 cycles
Final Extension	65°C, 3 min

Figura 40. Programa para PCR Multiplex con mayor rendimiento, (extraído de (Henegariu *et al.*, 1997)).

Organización del gel de agarosa

Los amplicones del gen candidato a amplificar debe tener una diferencia de tamaño

mínima de 50 pb. En los genes: TUBG1 y TUBA8 se proponen amplicónes con una diferencia de tamaño menor a 50 pb, por lo que no se deberán incluir en un mismo carril. Se tendrán que separa en dos carriles diferentes para evitar el empalme. A continuación se muestra un ejemplo grafico de cómo se deberán distribuir los amplicónes. En los carriles 5, 6 y 7 están los amplicónes de los genes (TUBB2A, TUBB2B y TUBB3) para los que se diseñó el primer degenerado (Figura 41).



Figura 41. Simulación de PCR Multiplex en gel de agarosa. 1) marcador de peso molecular de 100 pb, 2) y 3) amplicónes para TUBG1 en color azul, 4) amplicónes para TUBB en color verde, 5) amplicónes para TUBB2A en color púrpura y amplicón con primer degenerado en color negro, 6) amplicónes para TUBB2B en color rojo y amplicón con primer degenerado en color negro, 7) amplicónes para TUBB3 en color azul y amplicón con primer degenerado en color negro, 8) y 9) amplicónes para TUBA8 en color verde 10) amplicónes para TUBA3E en color púrpura, 11) amplicónes en color TUBA1A en color rojo.

Discusión

La estrategia PCR Multiplex propuesta está diseñada para evaluar un gen o genes asociados a un fenotipo de tubulinopatía distinguible. Como toda prueba genética, la PCR Multiplex también requiere de pruebas prácticas para considerar su rendimiento. De acuerdo con los estándares, para considerar una prueba genética adecuada para uso clínico, debe cumplir con 3 categorías: 1) validez analítica es el cumplimiento de los estándares para una prueba genética es decir, la precisión con el cual una característica genética es identificada por la prueba de laboratorio (CLIA) (<http://www.cms.hhs.gov/clia>); 2) validez clínica es cuando la prueba identifica el estado clínico de un paciente; y 3) utilidad clínica son los riesgos y beneficios resultantes del uso de la prueba (Burke, 2014). Actualmente, WES e incluso WGS se han convertido en técnicas relativamente económicas en el ámbito clínico, tomando en cuenta la cantidad de genes que se podrían analizar (Goswami and Harada, 2020). Debido a que la estrategia no ha sido probada ni estandarizada. La PCR Multiplex no pretende analizar todo el grupo de genes de tubulina, pues no sería una estrategia que compita con el rendimiento de WES o WGS. Una vez que la PCR Multiplex ha sido probada y estandarizada. Se sugiere su empleo en casos para amplificar uno, dos o incluso tres genes asociados. Esta cantidad depende del fenotipo distinguible del paciente. Habrá pacientes que no poseen un diagnóstico claro por lo que convendría el análisis por WES o por panel personalizado.

Conclusión

La estrategia propuesta en este capítulo requiere estandarización para implementarse como una herramienta alternativa en el diagnóstico genético de futuros casos de tubulinopatía con fenotipo asociado a genes específicos. El diagnóstico genético por PCR Multiplex pretende ser una alternativa menos costosa a la secuenciación del exoma completo para pacientes con tubulinopatía definida.

Referencias

- ALAZAMI, A. M., PATEL, N., SHAMSELDIN, H. E., ANAZI, S., AL-DOSARI, M. S., ALZHRANI, F., HIJAZI, H., ALSHAMMARI, M., ALDAHMEH, M. A. & SALIH, M. A. 2015. Accelerating novel candidate gene discovery in neurogenetic disorders via whole-exome sequencing of prescreened multiplex consanguineous families. *Cell reports*, 10, 148-161.
- BAHI-BUISSON, N. & CAVALLIN, M. 2016. Tubulinopathies overview. *GeneReviews*@[Internet]. University of Washington, Seattle.
- BAHI-BUISSON, N., POIRIER, K., FOURNIOL, F., SAILLOUR, Y., VALENCE, S., LEBRUN, N., HULLY, M., FALLET BIANCO, C., BODDAERT, N. & ELIE, C. 2014. The wide spectrum of tubulinopathies: what are the key features for the diagnosis? *Brain*, 137, 1676-1700.
- BIRCH, D. E., KOLMODIN, L., WONG, J., ZANGENBERG, G., ZOCCOLI, M., MCKINNEY, N. & YOUNG, K. 1996. Simplified hot start PCR. *nature*, 381, 445.
- BLUMKIN, L., HALEVY, A., BEN-AMI-RAICHMAN, D., DAHARI, D., HAVIV, A., SARIT, C., LEV, D., VAN DER KNAAP, M. S., LERMAN-SAGIE, T. & LESHINSKY-SILVER, E. 2014. Expansion of the spectrum of TUBB4A-related disorders: a new phenotype associated with a novel mutation in the TUBB4A gene. *neurogenetics*, 15, 107-113.
- BUDOWLE, B., LINDSEY, J. A., DECOU, J. A., KOONS, B. W., GIUSTI, A. & COMEY, C. 1995. Validation and population studies of the loci LDLR, GYPA, HBG, D7S8, and Gc (PM loci), and HLA-DQA using a multiplex amplification and typing procedure. *Journal of Forensic Science*, 40, 45-54.
- BURKE, W. 2014. Genetic tests: clinical validity and clinical utility. *Current protocols in human genetics*, 81, 9.15. 1-9.15. 8.
- CARDELLI, M. 2011. Alu PCR. *PCR Protocols*. Springer.
- CARTER, N. P., BEBB, C. E., NORDENSKJO, M., PONDER, B. A. & TUNNACLIFFE, A. 1992. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 13, 718-725.
- CARVALHO, D., SANTOS, S., MARTINS, B. & PINTO MARQUES, F. 2014. TUBB4A novel mutation reinforces the genotype-phenotype correlation of hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum. *Brain*, 138, e327-e327.
- COLLOMBAT, P., MANSOURI, A., HECKSHER-SØRENSEN, J., SERUP, P., KRULL, J., GRADWOHL, G. & GRUSS, P. 2003. Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes & development*, 17, 2591-2603.
- COOPER, G. M. & HAUSMAN, R. E. 2000. *The cell: a molecular approach*, ASM press Washington, DC.
- CUESTA, B. B., EXTREMERA, V. C., RODRÍGUEZ, A. D., PEÑAS, J. J. G. & GONZÁLEZ, L. Estudio de la Rentabilidad Diagnóstica de los estudios genéticos en los Trastornos de la Migración Neuronal.
- CUSHION, T. D., PACIORKOWSKI, A. R., PILZ, D. T., MULLINS, J. G., SELTZER, L. E., MARION, R. W., TUTTLE, E., GHONEIM, D., CHRISTIAN, S. L. & CHUNG, S.-K. 2014. De novo mutations in the beta-tubulin gene TUBB2A cause simplified gyral patterning and infantile-onset epilepsy. *The American Journal of Human Genetics*, 94, 634-641.
- CHAKRABORTI, S., NATARAJAN, K., CUIEL, J., JANKE, C. & LIU, J. 2016. The emerging role of the tubulin code: From the tubulin molecule to neuronal function and disease. *Cytoskeleton*, 73, 521-550.
- CHAMBERLAIN, J. S., GIBBS, R. A., RAINER, J. E., NGUYEN, P. N. & THOMAS, C. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic acids research*, 16, 11141-11156.
- CHEUNG, S. W., SHAW, C. A., YU, W., LI, J., OU, Z., PATEL, A., YATSENKO, S. A., COOPER, M. L., FURMAN, P. & STANKIEWICZ, P. 2005. Development and validation of a CGH microarray for clinical cytogenetic diagnosis. *Genetics in Medicine*, 7, 422-432.
- DE GUSMÃO, C. M., FUCHS, T., MOSES, A., MULTHAUP-BUELL, T., SONG, P. C., OZELIUS, L. J., FRANCO, R. A. & SHARMA, N. 2016. Dystonia-causing mutations as a contribution to the etiology of spasmodic dysphonia. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 155, 624-628.
- DE VRIES, B. B., PFUNDT, R., LEISINK, M., KOOLEN, D. A., VISSERS, L. E., JANSSEN, I. M., VAN REIJMERSDAL, S., NILLESEN, W. M., HUYS, E. H. & DE LEEUW, N. 2005. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *The American Journal of Human Genetics*, 77, 606-616.

- DOMINGUES, H. S., PORTUGAL, C. C., SOCODATO, R. & RELVAS, J. B. 2016. Oligodendrocyte, astrocyte, and microglia crosstalk in myelin development, damage, and repair. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 71.
- DUTCHER, S. K. 2001. The tubulin fraternity: alpha to eta. *Current opinion in cell biology*, 13, 49-54.
- DUTCHER, S. K. 2003. Long-lost relatives reappear: identification of new members of the tubulin superfamily. *Current opinion in microbiology*, 6, 634-640.
- ERRO, R., HERSHESON, J., GANOS, C., MENCACCI, N. E., STAMELOU, M., BATLA, A., THUST, S. C., BRAS, J. M., GUERREIRO, R. J. & HARDY, J. 2015. H-ABC syndrome and DYT4: Variable expressivity or pleiotropy of TUBB4 mutations? *Movement Disorders*, 30, 828-833.
- FAGERBERG, L., HALLSTRÖM, B. M., OKSVOLD, P., KAMPF, C., DJUREINOVIC, D., ODEBERG, J., HABUKA, M., TAHMASEBPOOR, S., DANIELSSON, A. & EDLUND, K. 2014. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13, 397-406.
- FALLET-BIANCO, C., LAQUERRIÈRE, A., POIRIER, K., RAZAVI, F., GUIMIOT, F., DIAS, P., LOEUILLET, L., LASCELLES, K., BELDJORD, C. & CARION, N. 2014. Mutations in tubulin genes are frequent causes of various foetal malformations of cortical development including microlissencephaly. *Acta neuropathologica communications*, 2, 69.
- FARELL, E. M. & ALEXANDRE, G. 2012. Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. *BMC research notes*, 5, 257.
- FERREIRA, C., PORETTI, A., COHEN, J., HAMOSH, A. & NAIDU, S. 2014. Novel TUBB4A mutations and expansion of the neuroimaging phenotype of hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum (H-ABC). *American Journal of Medical Genetics Part A*, 164, 1802-1807.
- FRACKMAN, S., KOBBS, G., SIMPSON, D. & STORTS, D. 1998. Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR. *Promega notes*, 65, 27-29.
- GALLAGHER, S. R. 2014. Overview of electrophoresis. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 8, 7.1. 1-7.1. 7.
- GOSWAMI, R. S. & HARADA, S. 2020. An Overview of Molecular Genetic Diagnosis Techniques. *Current protocols in human genetics*, 105, e97.
- HAMILTON, E. M., POLDER, E., VANDERVER, A., NAIDU, S., SCHIFFMANN, R., FISHER, K., RAGUŽ, A. B., BLUMKIN, L., GROUP, H.-A. R. & VAN BERKEL, C. G. 2014. Hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum: further delineation of the phenotype and genotype-phenotype correlation. *Brain*, 137, 1921-1930.
- HENEGARIU, O., HEEREMA, N., DLOUHY, S., VANCE, G. & VOGT, P. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 23, 504-511.
- HERSHESON, J., MENCACCI, N. E., DAVIS, M., MACDONALD, N., TRABZUNI, D., RYTEN, M., PITTMAN, A., PAUDEL, R., KARA, E. & FAWCETT, K. 2013. Mutations in the autoregulatory domain of β -tubulin 4a cause hereditary dystonia. *Annals of neurology*, 73, 546-553.
- HIROKAWA, N., NIWA, S. & TANAKA, Y. 2010. Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron*, 68, 610-638.
- JAGLIN, X. H., POIRIER, K., SAILLOUR, Y., BUHLER, E., TIAN, G., BAHU-BUISSON, N., FALLET-BIANCO, C., PHAN-DINH-TUY, F., KONG, X. P. & BOMONT, P. 2009. Mutations in the β -tubulin gene TUBB2B result in asymmetrical polymicrogyria. *Nature genetics*, 41, 746.
- JANKE, C. 2014. The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. *J Cell Biol*, 206, 461-472.
- JI, H., LI, D., WU, Y., ZHANG, Q., GU, Q., XIE, H., JI, T., WANG, H., ZHAO, L. & ZHAO, H. 2018. Hypomyelinating disorders in China: The clinical and genetic heterogeneity in 119 patients. *PLoS One*, 13, e0188869.
- JOSHI, H. C. & CLEVELAND, D. W. 1989. Differential utilization of beta-tubulin isotypes in differentiating neurites. *The Journal of cell biology*, 109, 663-673.
- JOYAL, K. M., MICHAUD, J., VAN DER KNAAP, M. S., BUGIANI, M. & VENKATESWARAN, S. 2018. Severe TUBB4A-Related Hypomyelination With Atrophy of the Basal Ganglia and Cerebellum: Novel

- Neuropathological Findings. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 78, 3-9.
- KANCHEVA, D., CHAMOVA, T., GUERGUELTICHEVA, V., MITEV, V., AZMANOV, D. N., KALAYDJIEVA, L., TOURNEV, I. & JORDANOVA, A. 2015. Mosaic dominant TUBB4A mutation in an inbred family with complicated hereditary spastic paraplegia. *Movement Disorders*, 30, 854-858.
- KEAYS, D. A., TIAN, G., POIRIER, K., HUANG, G.-J., SIEBOLD, C., CLEAK, J., OLIVER, P. L., FRAY, M., HARVEY, R. J. & MOLNÁR, Z. 2007. Mutations in α -tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. *Cell*, 128, 45-57.
- KLEINERT-ALTAMIRANO, PATRICIO-VILLAGRÁN JC, Fiesco-Roa MO, Gutiérrez-Arriola MC, Nájera-Díaz HJ, Martínez-Gutiérrez MJT & Zepeda-Zebadúa CC, (2016). Extracción dental en una paciente con distonía generalizada y mutilación lingual secundaria a Hipomielinización con atrofia de ganglios basales y cerebelo. *Revista Mexicana de Neurociencia* 2016, (278).
- KOLLMAN, J. M., POLKA, J. K., ZELTER, A., DAVIS, T. N. & AGARD, D. A. 2010. Microtubule nucleating γ -TuSC assembles structures with 13-fold microtubule-like symmetry. *nature*, 466, 879.
- KORF, B. R. & PAGON, R. A. 2003. Overview of Molecular Genetic Diagnosis. *Current protocols in human genetics*, 36, 9.1. 1-9.1. 10.
- KREADER, C. A. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1102-1106.
- KUSLICH, C. D., CHUI, B. & YAMASHIRO, C. T. 2018. Overview of PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, e27.
- LEANDRO-GARCÍA, L. J., LESKELÄ, S., LANDA, I., MONTERO-CONDE, C., LÓPEZ-JIMÉNEZ, E., LETÓN, R., CASCÓN, A., ROBLEDO, M. & RODRÍGUEZ-ANTONA, C. 2010. Tumoral and tissue-specific expression of the major human β -tubulin isotypes. *Cytoskeleton*, 67, 214-223.
- LEGUY, R., MELKI, R., PANTALONI, D. & CARLIER, M.-F. 2000. Monomeric γ -tubulin nucleates microtubules. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 21975-21980.
- LOCHER, H., DE ROOIJ, K. E., DE GROOT, J. C., VAN DOORN, R., GRUIS, N. A., LÖWIK, C. W., DE SOUSA LOPES, S. M. C., FRIJNS, J. H. & HUISMAN, M. A. 2013. Class III β -tubulin, a novel biomarker in the human melanocyte lineage. *Differentiation*, 85, 173-181.
- LOHMANN, K. & KLEIN, C. 2014. The many faces of TUBB4A mutations. *neurogenetics*, 15, 81-82.
- LOVE, J., LI, H., DOWNING, K. & NOGALES, E. 2001. Refined structure of α -tubulin at 3.5 Å resolution. *J Mol Biol*, 313, 1045-1057.
- LUDUEÑA, R. F. 1997. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *International review of cytology*. Elsevier.
- LUDUEÑA, R. F. & BANERJEE, A. 2008. The isotypes of tubulin. *The role of microtubules in cell biology, neurobiology, and oncology*. Springer.
- LUNDBERG, K. S., SHOEMAKER, D. D., ADAMS, M. W., SHORT, J. M., SORGE, J. A. & MATHUR, E. J. 1991. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*, 108, 1-6.
- MARCHLER-BAUER, A., BO, Y., HAN, L., HE, J., LANCZYCKI, C. J., LU, S., CHITSAZ, F., DERBYSHIRE, M. K., GEER, R. C. & GONZALES, N. R. 2016. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic acids research*, 45, D200-D203.
- MATTILA, P., KORPELA, J., TENKANEN, T. & PITKÄMEM, K. 1991. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase—an extremely heat stable enzyme with proofreading activity. *Nucleic acids research*, 19, 4967-4973.
- MCKEAN, P. G., VAUGHAN, S. & GULL, K. 2001. The extended tubulin superfamily. *Journal of cell science*, 114, 2723-2733.
- MILLER, D. T., SHEN, Y. & WU, B. L. 2012. Oligonucleotide microarrays for clinical diagnosis of copy number variation and zygosity status. *Current protocols in human genetics*, 74, 8.12. 1-8.12. 17.
- MIYATAKE, S., OSAKA, H., SHIINA, M., SASAKI, M., TAKANASHI, J.-I., HAGINOYA, K., WADA, T., MORIMOTO, M., ANDO, N. & IKUTA, Y. 2014. Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating leukoencephalopathies. *Neurology*, 82, 2230-2237.
- MOOMAW, B., MEDBERRY, S. & GALLAGHER, S. R. 2014. Overview of digital electrophoresis analysis. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 9, 7.5. 1-7.5. 31.
- MORITZ, M. & AGARD, D. A. 2001. γ -Tubulin complexes and microtubule nucleation. *Current opinion in*

- structural biology*, 11, 174-181.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 1986. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 263-273.
- MUTCH, C. A., PODURI, A., SAHIN, M., BARRY, B., WALSH, C. A. & BARKOVICH, A. J. 2016. Disorders of microtubule function in neurons: imaging correlates. *American journal of neuroradiology*, 37, 528-535.
- MUTIRANGURA, A., GREENBERG, F., BUTLER, M. G., MALCOLM, S., NICHOLLS, R. D., CHAKRAVARTI, A. & LEDBETTER, D. H. 1993. Multiplex PCR of three dinucleotide repeats in the Prader-Willi/Angelman critical region (15q11-q13): molecular diagnosis and mechanism of uniparental disomy. *Human molecular genetics*, 2, 143-151.
- NAHHAS, N., CONANT, A., HAMILTON, E., CUIEL, J., SIMONS, C., VAN DER KNAAP, M. & VANDERVER, A. 2016. TUBB4A-Related leukodystrophy.
- NAJAFOV, A. & HOXHAI, G. 2006. PCR guru. *A laboratory guide for beginners and experts.*[Libro en línea] Disponible en: < [www. pcr guru. com](http://www.pcr guru. com).
- NAVE, K.-A. & WERNER, H. B. 2014. Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 503-533.
- NIWA, S., TAKAHASHI, H. & HIROKAWA, N. 2013. β -Tubulin mutations that cause severe neuropathies disrupt axonal transport. *The EMBO journal*, 32, 1352-1364.
- NOGALES, E. & WANG, H.-W. 2006. Structural mechanisms underlying nucleotide-dependent self-assembly of tubulin and its relatives. *Current opinion in structural biology*, 16, 221-229.
- OTERO DOMÍNGUEZ, E., GÓMEZ LADO, C., FUENTES PITA, P., DACRUZ ÁLVAREZ, D., BARROS ANGUIERA, F. & EIRÍS PUÑAL, J. 2018. Leucodistrofia hipomielinizante de tipo 6. Claves clínicas y de neuroimagen en la detección de un nuevo caso. *Revista de Neurología*, 67, 339-342.
- PANDA, D., MILLER, H. P., BANERJEE, A., LUDUEÑA, R. F. & WILSON, L. 1994. Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 11358-11362.
- PARKER, N. 1985. Hereditary whispering dysphonia. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 48, 218-224.
- PARRINI, E., CONTI, V., DOBYNS, W. B. & GUERRINI, R. 2016. Genetic basis of brain malformations. *Molecular syndromology*, 7, 220-233.
- PIZZINO, A., PIERSON, T. M., GUO, Y., HELMAN, G., FORTINI, S., GUERRERO, K., SAITTA, S., MURPHY, J. L. P., PADIATH, Q. & XIE, Y. 2014. TUBB4A de novo mutations cause isolated hypomyelination. *Neurology*, 83, 898-902.
- POIRIER, K., LEBRUN, N., BROIX, L., TIAN, G., SAILLOUR, Y., BOSCHERON, C., PARRINI, E., VALENCE, S., SAINT PIERRE, B. & OGER, M. 2013. Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nature genetics*, 45, 639.
- POLIAK, S. & PELES, E. 2003. The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 968.
- PRUITT, K. D., TATUSOVA, T. & MAGLOTT, D. R. 2005. NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic acids research*, 33, D501-D504.
- PURNELL, S. M., BLEYL, S. B. & BONKOWSKY, J. L. 2014. Clinical exome sequencing identifies a novel TUBB4A mutation in a child with static hypomyelinating leukodystrophy. *Pediatric neurology*, 50, 608-611.
- RAINE, C. S. 1977. Morphological aspects of myelin and myelination. *Myelin*. Springer.
- RISINGER, A. L., GILES, F. J. & MOOBERRY, S. L. 2009. Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer treatment reviews*, 35, 255-261.
- ROACH, M. C., BOUCHER, V. L., WALSS, C., RAVDIN, P. M. & LUDUEÑA, R. F. 1998. Preparation of a monoclonal antibody specific for the class I isotype of β -tubulin: The β isotypes of tubulin differ in their cellular distributions within human tissues. *Cell motility and the cytoskeleton*, 39, 273-285.
- ROMANIELLO, R., ARRIGONI, F., FRY, A. E., BASSI, M. T., REES, M. I., BORGATTI, R., PILZ, D. T. & CUSHION, T. D. 2018. Tubulin genes and malformations of cortical development. *European journal of*

- medical genetics*, 61, 744-754.
- ROMERO, D. M., BAHI-BUISSON, N. & FRANCIS, F. Genetics and mechanisms leading to human cortical malformations. *Seminars in cell & developmental biology*, 2018. Elsevier, 33-75.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. & ERLICH, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491.
- SAMOCHA, K. E., ROBINSON, E. B., SANDERS, S. J., STEVENS, C., SABO, A., MCGRATH, L. M., KOSMICKI, J. A., REHNSTRÖM, K., MALLICK, S. & KIRBY, A. 2014. A framework for the interpretation of de novo mutation in human disease. *Nature genetics*, 46, 944.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-5467.
- SEIDMAN, J., KORF, B. R., MOIR, D. T., HAINES, J. L., DRACOPOLI, N. C., MORTON, C. C., SMITH, D. R. & SEIDMAN, C. E. 1995. *Current protocols in human genetics*, John Wiley.
- SHAFFER, L. G., BEAUDET, A. L., BROTHMAN, A. R., HIRSCH, B., LEVY, B., MARTIN, C. L., MASCARELLO, J. T. & RAO, K. W. 2007. Microarray analysis for constitutional cytogenetic abnormalities. *Genetics in Medicine*, 9, 654-662.
- SHENDURE, J. A., PORRECA, G. J., CHURCH, G. M., GARDNER, A. F., HENDRICKSON, C. L., KIELECZAWA, J. & SLATKO, B. E. 2011. Overview of DNA sequencing strategies. *Current protocols in molecular biology*, 96, 7.1. 1-7.1. 23.
- SHIMOJIMA, K., OKUMURA, A., IKENO, M., NISHIMURA, A., SAITO, A., SAITSU, H., MATSUMOTO, N. & YAMAMOTO, T. 2015. A de novo TUBB4A mutation in a patient with hypomyelination mimicking Pelizaeus–Merzbacher disease. *Brain and Development*, 37, 281-285.
- SHUBER, A. P., SKOLETSKY, J., STERN, R. & HANDELIN, B. L. 1993. Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex mutation analysis. *Human molecular genetics*, 2, 153-158.
- SIMONS, C., WOLF, N. I., MCNEIL, N., CALDOVIC, L., DEVANEY, J. M., TAKANOHASHI, A., CRAWFORD, J., RU, K., GRIMMOND, S. M. & MILLER, D. 2013. A de novo mutation in the β -tubulin gene TUBB4A results in the leukoencephalopathy hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum. *The American Journal of Human Genetics*, 92, 767-773.
- SONG, C., DUZKALE, H. & SHEN, J. 2018. Reporting of Clinical Genome Sequencing Results. *Current protocols in human genetics*, 98, e61.
- STRINGHAM, E. G., MARCUS-GUERET, N., RAMSAY, L. & SCHMIDT, K. L. 2012. Live cell imaging of the cytoskeleton. *Methods in enzymology*. Elsevier.
- SULLIVAN, K. F. & CLEVELAND, D. W. 1986. Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83, 4327-4331.
- TERPE, K. 2013. Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 10243-10254.
- THORVALDSDÓTTIR, H., ROBINSON, J. T. & MESIROV, J. P. 2013. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in bioinformatics*, 14, 178-192.
- TOUCHMAN, J. W. 2009. DNA sequencing: An outsourcing guide. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 2, 12.1. 1-12.1. 19.
- VAN DER KNAAP, M. S., BREITER, S. N., NAIDU, S., HART, A. A. & VALK, J. 1999. Defining and categorizing leukoencephalopathies of unknown origin: MR imaging approach. *Radiology*, 213, 121-133.
- VAN DER KNAAP, M. S., NAIDU, S., POUWELS, P. J., BONAVIDA, S., VAN COSTER, R., LAGAE, L., SPERNER, J., SURTEES, R., SCHIFFMANN, R. & VALK, J. 2002. New syndrome characterized by hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum. *American journal of neuroradiology*, 23, 1466-1474.
- VULINOVIC, F., KRAJKA, V., HAUSRAT, T. J., SEIBLER, P., ALVAREZ-FISCHER, D., MADDOEV, H., PARK, J. S., KUMAR, K. R., SUE, C. M. & LOHMANN, K. 2018. Motor protein binding and mitochondrial transport are altered by pathogenic TUBB4A variants. *Human mutation*, 39, 1901-1915.
- WADE, R. H. 2009. On and around microtubules: an overview. *Molecular biotechnology*, 43, 177-191.

- WAKEFIELD, J. G., MOORES, C. A., TOVEY, C. A. & CONDUIT, P. T. 2018. Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes and beyond. *Essays in biochemistry*, 62, 765-780.
- WILCOX, R. A., WINKLER, S., LOHMANN, K. & KLEIN, C. 2011. Whispering dysphonia in an Australian family (DYT4): a clinical and genetic reappraisal. *Movement Disorders*, 26, 2404-2408.
- YUEN, Y. T., GUELLA, I., ROLAND, E., SARGENT, M. & BOELMAN, C. 2019. novel TUBG1 mutations with milder neurodevelopmental presentations. *BMC medical genetics*, 20, 95.
- ZANGENBERG, G., SAIKI, R. & REYNOLDS, R. 1999. Multiplex PCR: optimization guidelines. *PCR Applications*. Elsevier.

Anexo 1

Las imagen de fotocomposición del gel de agarosa mostrados en: Figura 28 provienen de las imágenes originales mostradas en: Figura 42 y Figura 43.

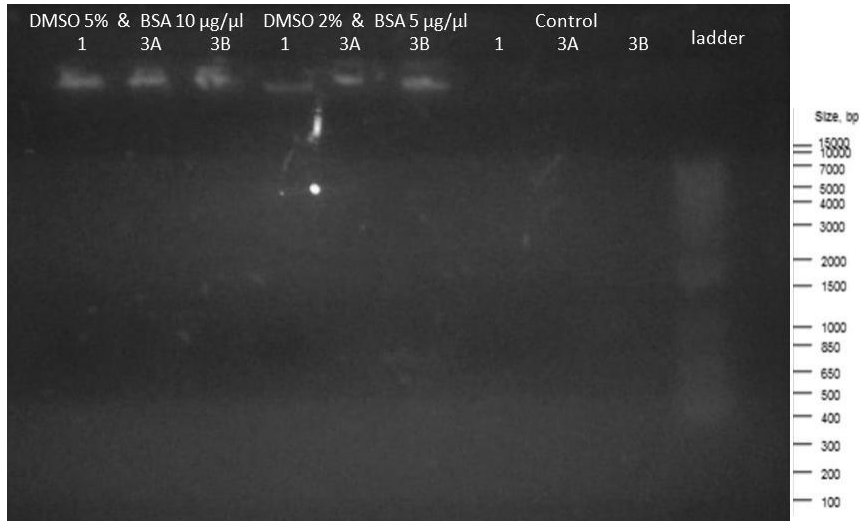


Figura 42. Gel de agarosa, corresponde al ensayo 4 con potenciadores.

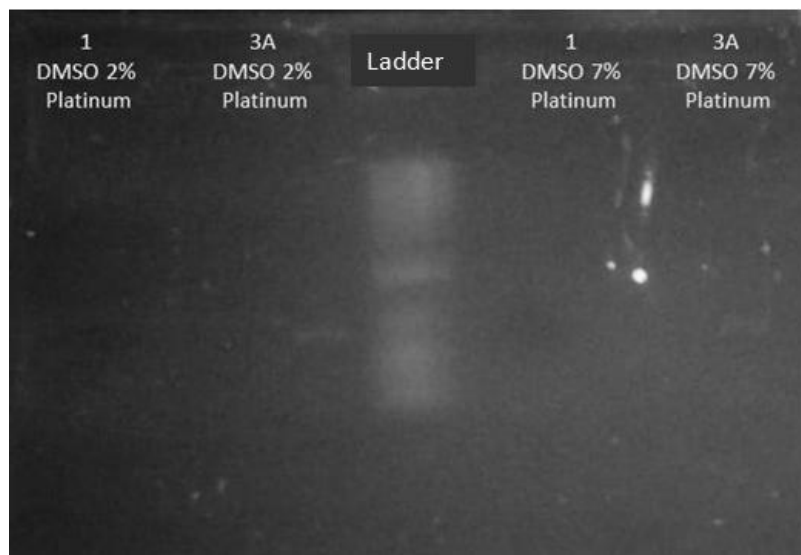


Figura 43. Gel de agarosa, corresponde al ensayo 4 con potenciadores.

Las imagen de fotocomposición del gel de agarosa mostrados en: Figura 29 proviene de las imagen original mostrada en Figura 44.

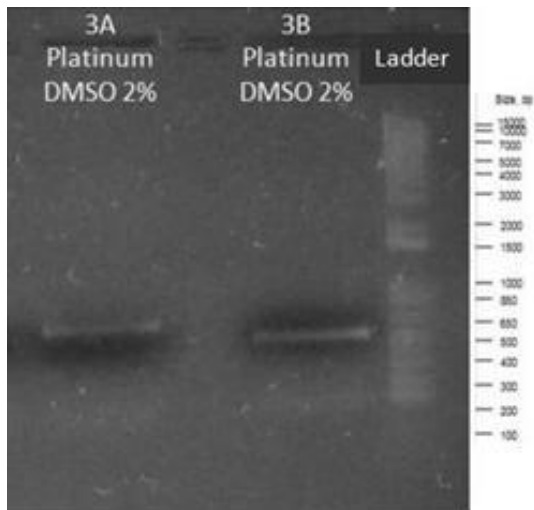


Figura 44. Gel de agarosa corresponde a la preparativa 4 con potenciadores