

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



Universidad de Guanajuato
División de Ciencias e Ingenierías

**“ANÁLISIS *IN VITRO* DE MUTACIONES GENÉTICAS DE
UNA ENFERMEDAD NEURODEGENERATIVA”**

Tesis presentada para obtener el grado académico de:
Maestra en Ciencias Aplicadas

Presenta:
Aurora Citlalli Montes Centeno
NUA: 427898

Asesores:
Dr. Víctor Hugo Hernández González
Dra. Silvia Alejandra López Juárez

León, Guanajuato
21 de octubre de 2025

Contenido

Agradecimientos	4
Resumen	5
Introducción.....	5
Tubulinopatías	5
Tubulinas como unidad estructural de los microtúbulos	6
<i>TUBB4A</i>	10
H-ABC	12
Modelo <i>taiep</i>	14
Importancia de diagnóstico genético en pacientes con H-ABC	16
Hipótesis	17
Objetivo General.....	17
Objetivos específicos	18
Materiales y métodos	19
Presentación del caso	19
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	19
Gel de electroforesis	20
Cuantificación de muestras.....	20
Secuenciación de muestras de PCR	21
Secuenciación del exoma.....	21
Cultivo Celular.....	22
Plásmidos	22
Transfección.....	23
Tinción con DAPI	24
Ensayo de concentración y viabilidad celular	25
Imágenes.....	25
Porcentaje de transfección	26
Resultados.....	27
Diagnóstico clínico de H-ABC de un paciente	27
Amplificación de <i>TUBB4A</i> del paciente.....	28
El paciente presenta una mutación silente en <i>TUBB4A</i>	29
Secuenciación del Exoma del paciente	32
Transfección de plásmidos.....	34

La TUBB4A A302T afecta el porcentaje de transfección.....	36
Discusión	40
Importancia del análisis de variantes genéticas	40
Mutaciones silentes: más allá de lo “benigno”	40
Secuenciación del exoma y hallazgos adicionales	41
Análisis funcional de la mutación A302T	41
Limitaciones del estudio	42
Conclusión.....	43
Perspectivas	43
Referencias.....	44

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que de una u otra forma hicieron posible que esta tesis se llevara a cabo.

En primer lugar, agradezco sinceramente a mis directores de tesis, Dr. Víctor Hugo Hernández González y Dra. Silvia Alejandra López Juárez, por su orientación constante, paciencia y confianza en mí. Gracias por guiarme, por enseñarme a enfrentar los retos científicos con rigor y por motivarme a siempre buscar la excelencia.

A la Dra. Ilane Hernández Morales, que me ha acompañado en este camino desde la licenciatura, le expresó mi más profundo agradecimiento por ayudarme a concluir distintas etapas de mi vida académica y por ser una gran guía como persona, tutora e investigadora.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, gracias por los momentos de aprendizaje compartido, y por hacer del trabajo diario un espacio de apoyo. Cada discusión, consejo y risa compartida dejó una huella importante en esta experiencia.

A mi familia, especialmente a mis padres Santiago y Aurora, a mis hermanos Omar y Santi, a mis seres queridos, gracias por su amor incondicional, por creer en mí aun cuando yo dudaba y por darme la fuerza para seguir adelante en los momentos difíciles. Su apoyo y confianza han sido mi motor para alcanzar este logro.

Finalmente, agradezco a la Universidad de Guanajuato, División de Ciencias e Ingenierías, Campus León, por brindarme las herramientas, instalaciones y oportunidades que hicieron posible esta investigación.

A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento: su apoyo, enseñanza y cariño han hecho de este proyecto una experiencia inolvidable.

Resumen

Las tubulinopatías comprenden un grupo heterogéneo de trastornos neurológicos causados por mutaciones en genes que codifican isoformas de tubulina, proteínas esenciales para la dinámica de los microtúbulos. Entre ellas, el síndrome H-ABC (hipomielinización con atrofia del núcleo basal y cerebelo) se ha asociado principalmente con variantes patogénicas en *TUBB4A*, el cual desempeña un papel crucial en la organización estructural y funcional del sistema nervioso central. En este trabajo se presenta el diagnóstico genético de un paciente con fenotipo clínico sugestivo de H-ABC, complementado con estudios de expresión génica en células HeLa, donde se evaluó la isoforma silvestre (WT) y la variante mutada A302T, descrita en el modelo murino *taiep*, caracterizado por defectos en la mielinización y alteraciones motoras progresivas. Este enfoque permitió profundizar en los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis de las tubulinopatías y aporta evidencia funcional sobre el impacto de mutaciones específicas en *TUBB4A*.

Introducción

Tubulinopatías

Las tubulinopatías son un grupo de enfermedades neurológicas causadas por mutaciones en genes que codifican isoformas de tubulina. Estas alteraciones genéticas afectan la estructura y función de los microtúbulos, además de procesos celulares críticos como la migración neuronal, la organización cortical y el transporte intracelular, lo que conduce a malformaciones cerebrales complejas y a un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que incluyen retraso en el desarrollo psicomotor, trastornos del movimiento, epilepsia y alteraciones en la mielinización del sistema nervioso central (Gonçalves et al., 2018; Maillard et al., 2023).

Este grupo de enfermedades se caracteriza por un espectro clínico y radiológico diverso, que incluye lisencefalia, disgenesia del cuerpo calloso, displasia del tronco encefálico y anomalías en los ganglios basales (Bahi-Buisson et al., 2014).

Tubulinas como unidad estructural de los microtúbulos

Las tubulinas son proteínas fundamentales en la arquitectura celular, encargadas de formar los microtúbulos, estructuras dinámicas que participan en procesos esenciales como la división celular, el transporte intracelular, la migración neuronal y el mantenimiento de la forma celular (Desai and Mitchison, 1997). Existen diversas isoformas de tubulina, entre ellas las alfa y beta, que se ensamblan en heterodímeros para formar la red de microtúbulos. Según la literatura existen nueve tipos de alfa tubulina : TUBA1A, TUBA1B, TUBA1C, TUBA4A, TUBA4B, TUBA3C, TUBA3D, TUBA3E, TUBA8 y existen nueve tipos de beta tubulinas: TUBB, TUBB1, TUBB2A, TUBB2B, TUBB3, TUBB4A, TUBB4B, TUBB6 y TUBB8 (Sferra et al., 2023). Otra isoforma de esta familia de proteínas es la tubulina gamma (γ), que aunque no se incorpora directamente en los microtúbulos como las isoformas alfa y beta, desempeña un papel crucial en su nucleación (Farache et al., 2018; Kollman et al., 2011; Nick, 2017). Esta isoforma se localiza principalmente en el centrosoma (**Figura 1D**), donde forma parte del complejo γ -TuRC (gamma-tubulin ring complex), que actúa como plantilla estructural para el ensamblaje polarizado de protofilamentos, iniciando así la organización espacial del citoesqueleto microtubular (Roostalu and Surrey, 2017).

Las tubulinas alfa (α) y beta (β) se combinan en el citoplasma para formar heterodímeros α/β , que constituyen la unidad fundamental de los microtúbulos (**Figura 1A**). Estos heterodímeros se ensamblan de manera lineal, dando origen a estructuras llamadas protofilamentos (**Figura 1B**). A su vez, trece protofilamentos se organizan lateralmente para formar un cilindro hueco: el microtúbulo (**Figura 1C**). Esta estructura presenta una polaridad intrínseca, con un extremo positivo (+) y uno negativo (-) (**Figura 1D**). El extremo positivo es dinámico y permite un crecimiento más rápido, mientras que el extremo negativo suele estar anclado al centrosoma y muestra una tasa de elongación más lenta. Esta polaridad es esencial para la organización celular, el transporte intracelular y la orientación espacial de los procesos celulares (Desai and Mitchison, 1997).

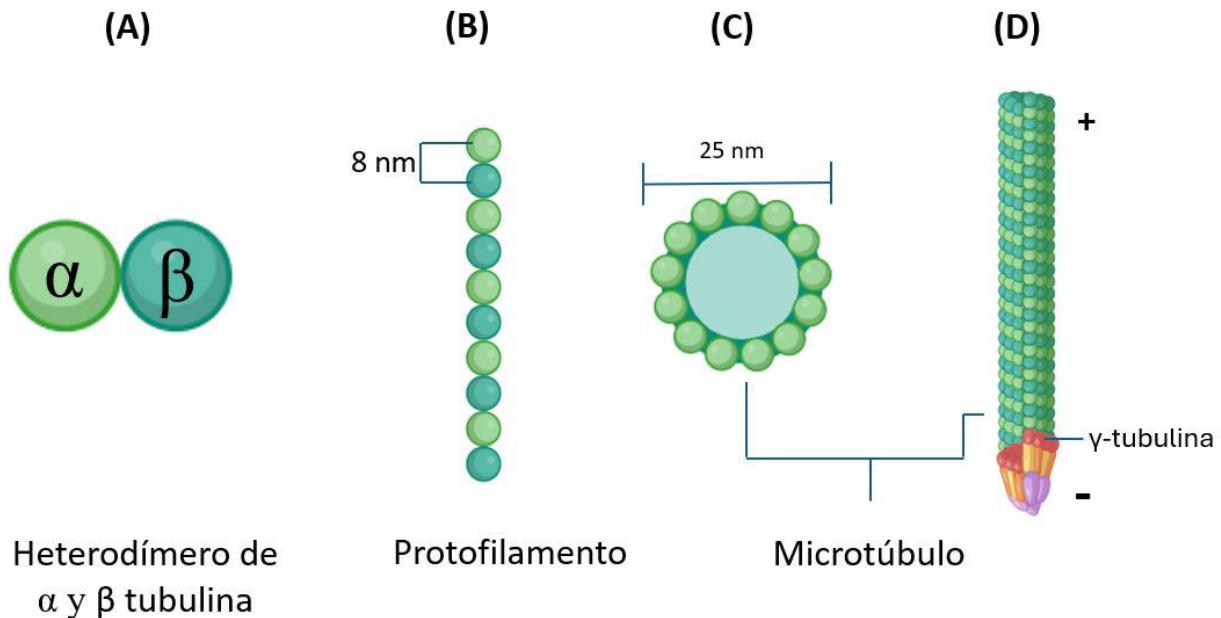


Figura 1. Estructura de los microtúbulos. (A) Se muestra el heterodímero que forma las proteínas alfa y beta tubulina. (B) Representación de un prototípico que está formado por diversos dímeros de $\alpha\beta$ tubulina y cada uno de estos dímeros mide 8 nm. (C) Se muestra que el microtúbulo está formado por 13 prototípico y mide 25 nm de diámetro. (D) Se representa la polaridad del microtúbulo con los extremos + y -, además se representa el complejo en anillo de γ -tubulina. Imagen realizada en Biorender basada en la figura 1 de (Desai and Mitchison, 1997) y figura 1 y 4 de (Roostalu and Surrey, 2017).

El ensamblaje del microtúbulo ocurre principalmente en el extremo positivo (+) donde los heterodímeros se incorporan rápidamente. Este crecimiento está impulsado por la unión de GTP a la tubulina β , que estabiliza la estructura. Mientras el extremo positivo mantiene una “capucha de GTP”, el microtúbulo continúa elongándose de forma estable, como se muestra en la **Figura 2** (Desai and Mitchison, 1997). El extremo negativo (-), por otro lado, suele estar anclado al centrosoma o al complejo de nucleación γ -tubulina, y muestra una tasa de crecimiento mucho más lenta o nula (Kollman et al., 2011b).

El desensamblaje ocurre cuando la tubulina β hidroliza el GTP a GDP, lo que provoca una pérdida de estabilidad en el extremo positivo. Si la “capucha de GTP” desaparece, el microtúbulo entra en una fase de catástrofe, despolimerizándose rápidamente (**Figura 2**). Este fenómeno es parte de la llamada inestabilidad dinámica, que permite a los microtúbulos alternar entre fases de crecimiento y acortamiento (Mitchison and Kirschner, 1984).

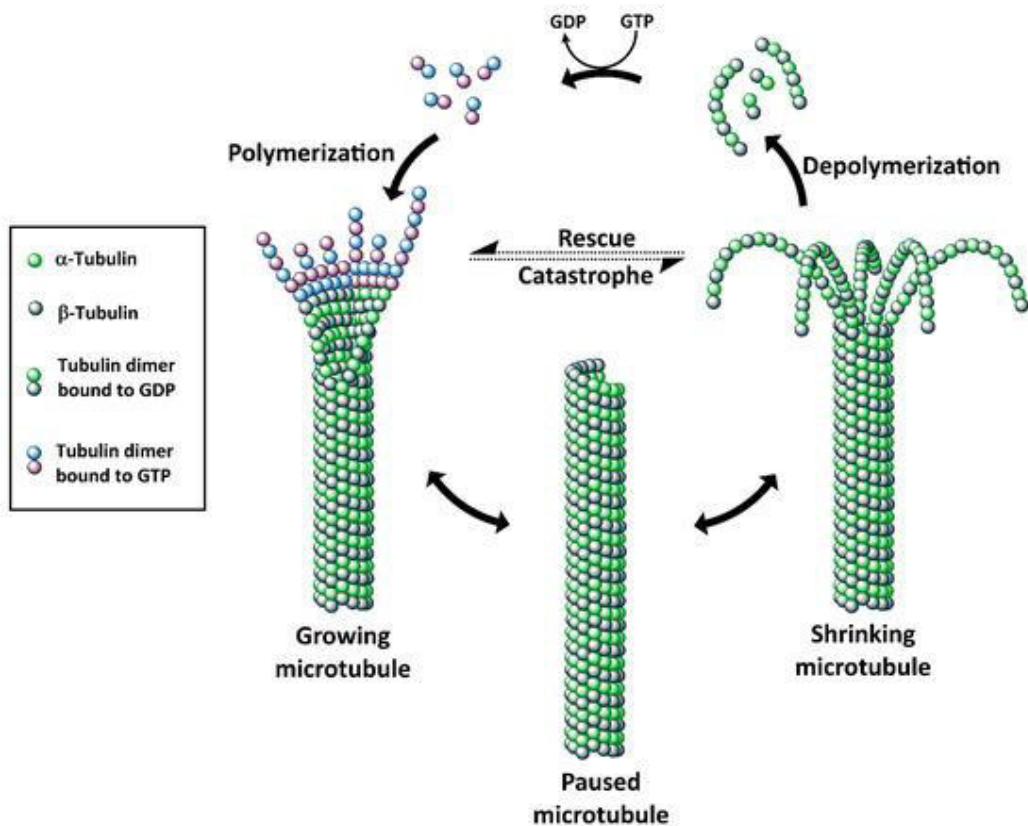


Figura 2. Representación del ensamblaje dinámico de microtúbulos. Los heterodímeros de tubulina α/β se incorporan preferentemente en el extremo positivo (+), promoviendo el crecimiento. La hidrólisis de GTP en la tubulina β desencadena la desestabilización del extremo, lo que conduce a la despolimerización o catástrofe estructural. Imagen recuperada de (Chen et al., 2017).

La relevancia funcional de las tubulinas en la organización celular y en procesos como la migración neuronal, el transporte intracelular y la división celular ha quedado ampliamente establecida. Sin embargo, en años recientes, se ha evidenciado que las mutaciones en los genes que codifican estas proteínas pueden alterar la dinámica de los microtúbulos y desencadenar un conjunto diverso de enfermedades genéticas, conocidas como tubulinopatías (Bahi-Buisson et al., 2014).

Las variantes patogénicas se han identificado en genes como *TUBB4A*, *TUBA1A*, *TUBB2B*, *TUBB3*, *TUBB2A*, *TUBB5* y *TUBA8*, cada uno asociado a fenotipos específicos, aunque con solapamientos clínicos significativos. (Bahi-Buisson and Maillard, 2016; Gonçalves et al., 2018). A continuación, se presenta la lista de genes en los que sus variantes se han asociado con alguna tubulinopatía:

- TUBA1A: Se asocia con lissencefalia, una malformación cortical grave caracterizada por la pérdida de pliegues y surcos, que da lugar a un cerebro anormalmente liso (Hebebrand et al., 2019).
- TUBB2A: Se vincula con trastornos del neurodesarrollo, que comúnmente incluyen epilepsia de inicio temprano y diversas formas de malformaciones del desarrollo cortical (MCD) (Cai et al., 2020).
- TUBB2B: Variantes en este gen han sido relacionadas con polimicrogiria, una condición definida por la presencia de numerosos pliegues corticales pequeños e irregulares, que alteran la organización normal de la corteza cerebral (Schröter et al., 2021).
- TUBB3: Mutaciones en esta región provocan la fibrosis congénita de los músculos extraoculares tipo 3 (CFEOM3), un trastorno caracterizado por restricción severa del movimiento ocular, asociado frecuentemente con discapacidad intelectual, debilidad motora de las extremidades y neuropatía periférica progresiva (Sibello Deustua et al., 2022).
- TUBB5: Se ha descrito que las mutaciones en este gen generan principalmente microcefalia congénita, acompañada de diversas alteraciones estructurales del sistema nervioso central (Ngo et al., 2014).
- TUBG1: Relacionado principalmente con lissencefalia asociada a microcefalia y epilepsia de inicio temprano, con patrones típicos de afectación cortical posterior (Poirier et al., 2013).
- TUBB4A: Se ha descrito que mutaciones en este gen pueden provocar distonía aislada tipo 4 (DYT4) o Hipomielinización con Atrofia de los ganglios Basales y el Cerebelo (H-ABC) (Krajka et al., 2022).
- TUBA8: finalmente, se consideró este gen por su asociación con un fenotipo que incluye polimicrogiria bilateral, disgenesia del cuerpo calloso e hipoplasia del nervio óptico, todo ello resultado de defectos en la organización y migración cortical (Abdollahi et al., 2009).

El diagnóstico de las tubulinopatías requiere una correlación rigurosa entre los hallazgos genéticos y las imágenes obtenidas mediante resonancia magnética, lo cual permite una clasificación más precisa y una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares implicados. En este contexto, las tubulinopatías se destacan como un modelo relevante para el estudio funcional de los microtúbulos en el desarrollo cerebral humano. El presente trabajo se enfoca en el análisis de mutaciones en *TUBB4A*, dada su implicación crítica en un subgrupo específico de tubulinopatías, particularmente aquellas asociadas con alteraciones en los procesos de mielinización y en la organización estructural del cerebro.

TUBB4A

El gen *TUBB4A* está ubicado en el cromosoma 19p13.3, tiene una longitud de aproximadamente 2,300 nucleótidos y 444 aminoácidos (Weizmann Institute of Science, s.f). Codifica para la proteína tubulina beta 4A, una subunidad estructural fundamental de los microtúbulos y presenta una expresión predominante en el sistema nervioso central, particularmente en oligodendrocitos, células responsables de la mielinización axonal (Curiel et al., 2017; Duncan et al., 2017; Nave, 2010). Los oligodendrocitos tienen la función de formar la vaina de mielina que rodea a los axones, la mielina sirve como una capa aislante para que los impulsos eléctricos puedan transportarse de forma rápida y eficaz a lo largo del axón (**Figura 3**).

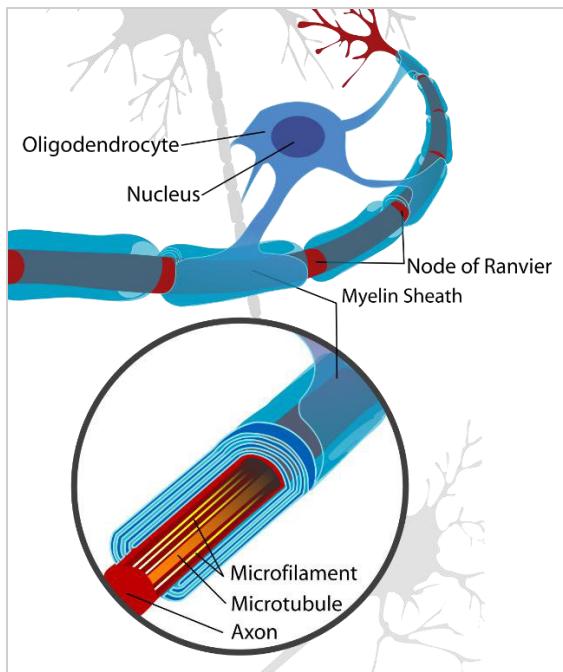


Figura 3. Función de los oligodendrocitos. El oligodendrocyto (azul) forma la vaina de mielina que envuelve el axón (rojo), facilitando la conducción rápida de impulsos eléctricos. Los nodos de Ranvier interrumpen la mielina en intervalos regulares, permitiendo la propagación del potencial de acción. En el interior del axón, los microtúbulos y microfilamentos constituyen el citoesqueleto, proporcionando soporte estructural y vías para el transporte intracelular de organelos y vesículas. Imagen recuperada de: <https://www.simplypsychology.org/myelin-sheath.html>.

La tubulina β -4A participa activamente en la dinámica de los microtúbulos y su expresión se incrementa durante el desarrollo postnatal, coincidiendo con la maduración de los oligodendrocitos y el inicio de la mielinización (Kuhn et al., 2019). Estudios recientes han demostrado que ciertas mutaciones en *TUBB4A* pueden alterar la estabilidad de los microtúbulos, provocando su acumulación anormal y asociándose con procesos de hipomielinización en el sistema nervioso central (Duncan et al., 2017).

Diversas variantes genéticas en el gen *TUBB4A* han sido asociadas con trastornos neurodegenerativos, entre ellos la distonía aislada tipo 4 (DYT4) y la hipomielinización con atrofia de los ganglios basales y el cerebelo (H-ABC) (Curiel et al., 2017; Krajka et al., 2022). No obstante, los mecanismos moleculares precisos que vinculan estas mutaciones con la manifestación clínica de dichas enfermedades aún no se comprenden por completo.

En particular, la hipomielinización con atrofia de los ganglios basales y el cerebelo (H-ABC) representa una de las entidades clínicas más relevantes asociadas a mutaciones en *TUBB4A*, debido a su fenotipo característico y progresivo, así como a su impacto funcional en el sistema nervioso central. Esta enfermedad constituye el foco principal del presente trabajo, dado que su estudio permite explorar de manera más profunda la relación entre alteraciones genéticas específicas, las manifestaciones clínicas y los mecanismos celulares que afectan la mielinización y la arquitectura cerebral. A continuación, se describe en detalle el cuadro clínico, los hallazgos imagenológicos y las bases genéticas que definen a H-ABC como un modelo paradigmático dentro del espectro de las tubulinopatías.

H-ABC

La Hipomielinización con Atrofia de los Ganglios Basales y el Cerebelo (H-ABC) es una enfermedad neurodegenerativa poco frecuente, recientemente caracterizada, cuyo origen genético se ha vinculado a mutaciones en *TUBB4A* (Simons et al., 2013). Existen diversas mutaciones que resultan en el fenotipo de H-ABC, en la **Figura 4** se muestra una representación de las regiones principales de *TUBB4A* y de sus variantes patogénicas humanas descritas en la literatura. Entre ellas se encuentra resaltada la mutación Asp249Asn que es la de mayor prevalencia en los pacientes y además fue la variante encontrada en el primer paciente identificado en México con H-ABC por nuestro grupo de investigación (Lopez-Juarez et al., 2021).

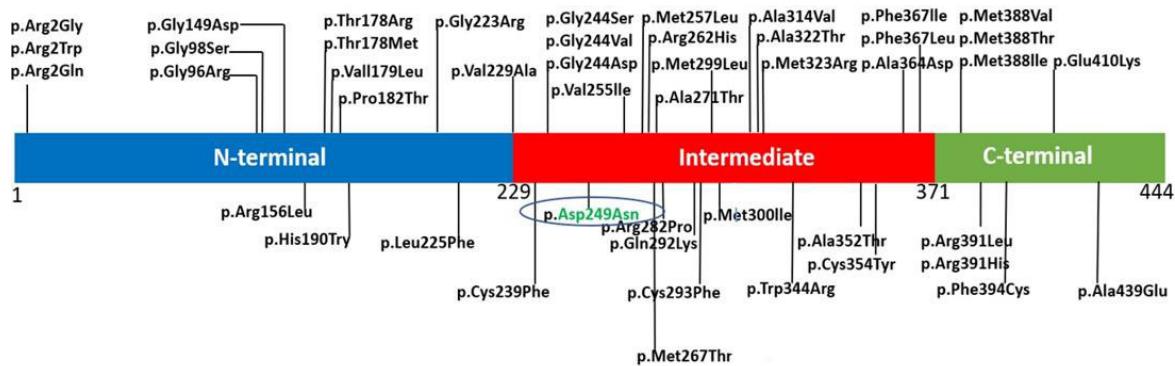


Figura 4. Representación esquemática de la proteína TUBB4A. Se muestran las regiones N-terminal (azul), intermedia (rojo) y C-terminal (verde), junto con las mutaciones asociadas a la enfermedad H-ABC. Las etiquetas indican sustituciones de aminoácidos específicas (por ejemplo, p.Arg2Gly), distribuidas a lo largo de la secuencia proteica. La mutación p.Asp249Asn, destacada en óvalo verde, ha sido identificada como una de las variantes patogénicas con mayor prevalencia en pacientes con H-ABC. Imagen elaborada por el grupo de investigación de la Dra. Valeria Piazza del Centro de Investigaciones en Óptica.

Las variantes patogénicas en *TUBB4A* alteran procesos fundamentales en la célula como la dinámica de los microtúbulos, la organización citoesquelética y el transporte intracelular, afectando directamente la mielinización y comprometiendo la integridad estructural y funcional del sistema nervioso central, lo que se traduce en el fenotipo clínico observado en los pacientes con H-ABC (Simons et al., 2013; Van Der Knaap et al., 2002).

Desde la infancia temprana, los pacientes con H-ABC comienzan a mostrar signos clínicos como retrasos en el desarrollo motor, espasticidad, distonía progresiva, ataxia cerebelosa y episodios de epilepsia (Hamilton et al., 2014). Aunque el curso de la enfermedad suele ser degenerativo, existe una considerable variabilidad en la forma en que se manifiesta en cada individuo, lo que complica su diagnóstico y seguimiento. Estos signos corresponden con alteraciones estructurales observadas mediante resonancia magnética, donde se evidencia una hipomielinización difusa junto con atrofia en el cerebelo, los ganglios basales y otras estructuras cerebelosas (Alata et al., 2021; Van Der Knaap et al., 2002), como se muestra en la **Figura 5**.

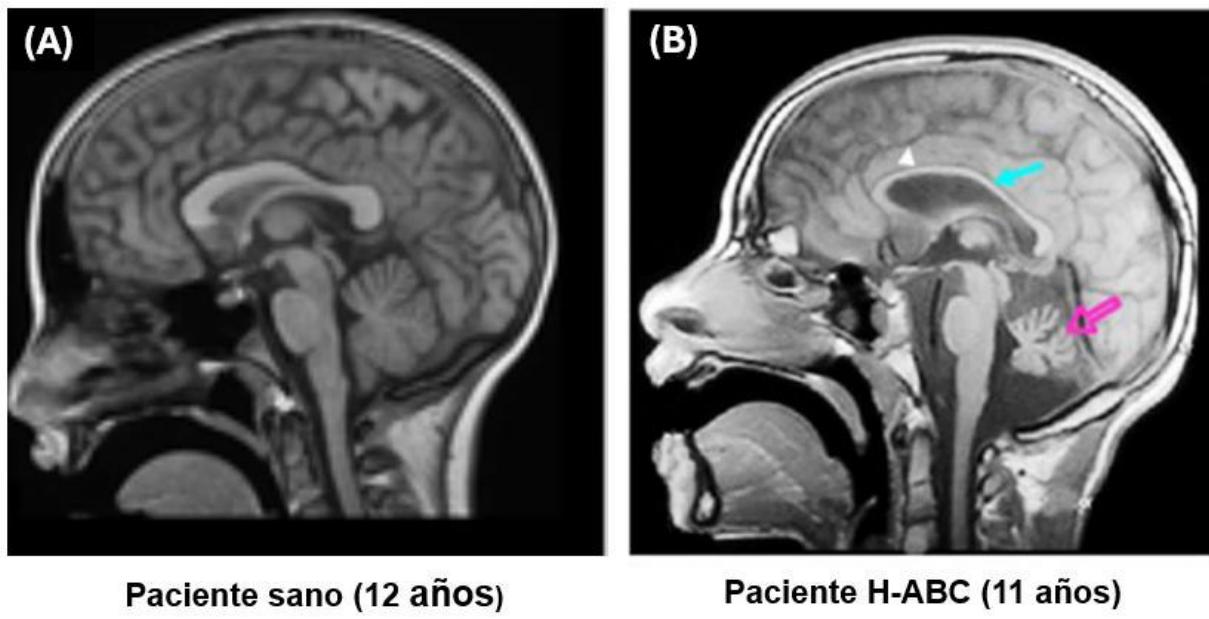


Figura 5. Comparación de imágenes por resonancia magnética de un paciente sano y un paciente con H-ABC. (A) Se observa una arquitectura cerebral típica en un niño de 12 años. (B) Correspondiente a un paciente de 11 años con H-ABC, se evidencian alteraciones estructurales características, incluyendo hipomielinización difusa, atrofia del cuerpo calloso (flecha cian) y del cerebelo (flecha magenta). Imágenes extraídas de (Chakraborti et al., 2016) y (Alata et al., 2021).

La rareza de esta enfermedad, junto con su presentación clínica y genética compleja, representa un desafío diagnóstico y terapéutico, pero a pesar de esto, se ha logrado tener un avance significativo gracias a los modelos animales que replican aspectos clave de la fisiopatología observada en humanos. En este trabajo nos centraremos en describir uno de los modelos de estudio de H-ABC, la rata *taiep*.

Modelo *taiep*

La rata *taiep* (acrónimo de Temblor, Ataxia, Inmovilidad, Epilepsia, Parálisis) ha emergido como un modelo espontáneo y altamente relevante para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares implicados en H-ABC (Lopez-Juarez et al., 2021). Esta rata presenta una mutación en el mismo gen de los pacientes humanos, TUBB4A, donde existe un cambio de una alanina por una treonina en la posición 302 (**A302T**) (Garduno-Robles et al., 2020).

La rata *taiep* exhibe una reducción significativa en la mielina del SNC, particularmente en las vías espinales, cerebelosas y telencefálicas, así como alteraciones en los oligodendrocitos, donde presentan una abundancia anormal de microtúbulos que se organizan en forma de cúmulos lineales y pueden encontrarse cerca del retículo endoplásmico y la envoltura externa del núcleo (**Figura 6**), esta alteración en la estructura de los microtúbulos compromete la capacidad de los oligodendrocitos para llevar a cabo y mantener el proceso de mielinización (Duncan et al., 2017, 1992). Estas características hacen de *taiep* un modelo valioso para investigar la progresión de la desmielinización y los procesos degenerativos asociados.

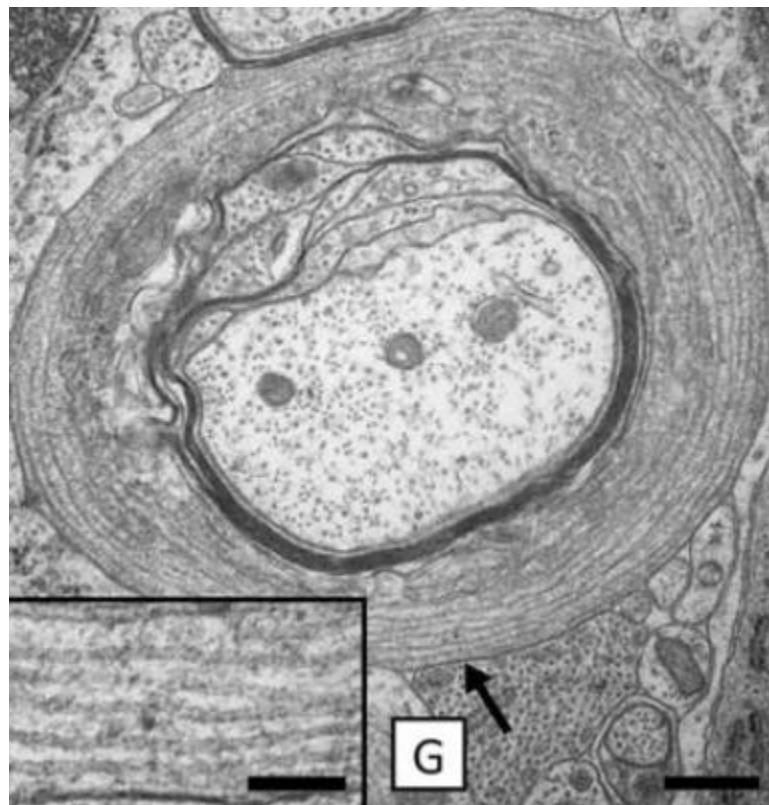


Figura 6. Acumulación de microtúbulos en axones mielinizados en tejido nervioso de rata *taiep*. La imagen ampliada del área señalada (flecha) permite observar con mayor detalle la acumulación anormal de microtúbulos (recuadro), lo cual podría estar relacionado con alteraciones en la mielinización. Imagen recuperada de (Duncan et al., 2017)

Desde el punto de vista conductual, esta cepa muestra un fenotipo complejo que incluye temblor postural, ataxia, episodios de inmovilidad y crisis epilépticas, lo que permite correlacionar la progresión del daño estructural con manifestaciones clínicas observables. Estas manifestaciones neurológicas han permitido emplear el modelo *taiep* en estudios preclínicos para terapias génicas, posicionándolo como una herramienta experimental robusta para el abordaje de patologías como H-ABC (Alata et al., 2021; Garduno-Robles et al., 2020).

Importancia de diagnóstico genético en pacientes con H-ABC

En las últimas décadas, el diagnóstico molecular ha revolucionado la forma en que se identifican y clasifican las enfermedades neurológicas poco comunes, particularmente aquellas con manifestaciones clínicas heterogéneas como H-ABC. Esta enfermedad presenta un espectro clínico que puede solaparse con otras leucoencefalopatías, lo que dificulta su diagnóstico únicamente a partir de criterios clínicos y hallazgos radiológicos

La incorporación de herramientas de secuenciación genética, como el exoma clínico, ha permitido detectar variantes patogénicas específicas que confirman el diagnóstico. En este contexto, la identificación de mutaciones no solo valida la sospecha clínica, sino que también proporciona información crucial para el pronóstico del paciente, la toma de decisiones terapéuticas y el asesoramiento genético familiar. Esta precisión diagnóstica es especialmente relevante en enfermedades neurodegenerativas de inicio temprano, donde el curso clínico puede ser progresivo y severo.

La primera parte de este trabajo presenta el proceso y los resultados de un diagnóstico genético realizado a un paciente de 7 años, cuyos signos clínicos, junto con los hallazgos obtenidos mediante estudios de resonancia magnética, permitieron establecer un diagnóstico clínico altamente sugestivo de H-ABC. El estudio molecular mediante la identificación de una variante en el gen *TUBB4A* permitió aportar información relevante para el manejo clínico y genético del caso.

La segunda parte este proyecto consistió en abundar en el conocimiento de los procesos fisiopatológicos que se presentan en esta enfermedad. El estudio de mutaciones patológicas en

sistemas celulares representa una herramienta fundamental para comprender esos procesos. Las células cultivadas *in vitro* permiten observar de manera controlada cómo una variante específica, como por ejemplo A302T, afecta la organización del citoesqueleto, la dinámica de los microtúbulos y la función celular. Este enfoque experimental proporciona una ventana directa hacia los efectos celulares de mutaciones puntuales, que en modelos animales o humanos pueden estar enmascarados por la complejidad del entorno fisiológico.

Para abordar esto, se utilizó un sistema de transfección en células HeLa para comparar la expresión y distribución de la proteína TUBB4A mutada (A302T) frente a su forma silvestre, empleando un marcador fluorescente (GFP). Esta estrategia permitió visualizar alteraciones en la función celular, lo cual nos proporciona información sobre su implicación funcional observada en pacientes con H-ABC. El análisis celular complementa el diagnóstico genético fortaleciendo la comprensión de los procesos celulares implicados en esta tubulinopatía.

Hipótesis

La identificación de una variante patogénica en *TUBB4A* de un paciente con diagnóstico clínico sugestivo de H-ABC confirmará el diagnóstico de tubulinopatía. Por otro lado, la mutación A302T afectará la viabilidad celular y la eficiencia de transfección en comparación con la forma silvestre de *TUBB4A*.

Objetivo General

Complementar el diagnóstico genético de un paciente con sospecha clínica de H-ABC a través de la identificación molecular de variantes patogénicas. Analizar la viabilidad celular y la eficiencia de transfección en células transfectadas con la variante A302T en *TUBB4A*, como paso inicial para la caracterización funcional de sus efectos.

Objetivos específicos

- a) Identificar variantes en *TUBB4A* mediante técnicas de secuenciación genética en un paciente con diagnóstico clínico presuntivo de H-ABC.
- b) Identificar variantes genéticas en genes asociados a tubulinopatías mediante el análisis del exoma completo del paciente, con el fin de contribuir al diagnóstico molecular.
- c) Establecer parámetros experimentales óptimos para la transfección de TUBB4A-WT-GFP, TUBB4A-A302T-GFP y pAC γ -actin
- d) Cuantificar la viabilidad celular posterior a la transfección y determinar el porcentaje de células transfectadas en los diferentes grupos experimentales.

Materiales y métodos

Presentación del caso

Paciente masculino de 7 años que presenta retraso en la adquisición de hitos del desarrollo e hipertonía generalizada detectada desde los 7 meses. La exploración física muestra ataxia, posturas distónicas en las extremidades, temblor de acción y deterioro motor. No existen antecedentes de enfermedades neurológicas en la familia. Se realiza estudio de resonancia magnética nuclear la cual muestra atrofia del cuerpo calloso y de los ganglios basales, paquigiria, licencefalia y compromiso de las fibras en U. No se observa atrofia cerebelosa. Con base en los datos clínicos y los resultados de la resonancia se establece el diagnóstico presuntivo de H-ABC. Se realizó un asentimiento informado para el paciente que fue aprobado con la firma del padre.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para confirmar el diagnóstico genético, se llevó a cabo una amplificación del gen *TUBB4A* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando ADN genómico purificado (64 ng/μl) extraído de una muestra de saliva del paciente mediante el kit Oragene OG500 (DNA Genotek, Canada), quien presentaba manifestaciones clínicas compatibles con H-ABC.

Considerando que *TUBB4A* consta de cinco exones, se decidió amplificar el gen en cuatro fragmentos independientes (**Figura 7A**), con la finalidad de reducir los errores de replicación generados por la polimerasa y asegurar una mayor fidelidad en la amplificación. Para ello, se realizaron reacciones de PCR con un volumen total de 200 μl; además se utilizaron dos enzimas distintas: Crystal Taq Master 2× (Jena Bioscience, Cat. No. PCR-166S) para el fragmento 2 y Hot Start Taq 2× Master Mix (Accuris, Cat. No. 20586AC104) para los fragmentos 1,3 y 4.

Los volúmenes específicos de cada componente y los programas de amplificación utilizados en el termociclador para cada uno de los fragmentos se detallan en la **Figura 7B**.

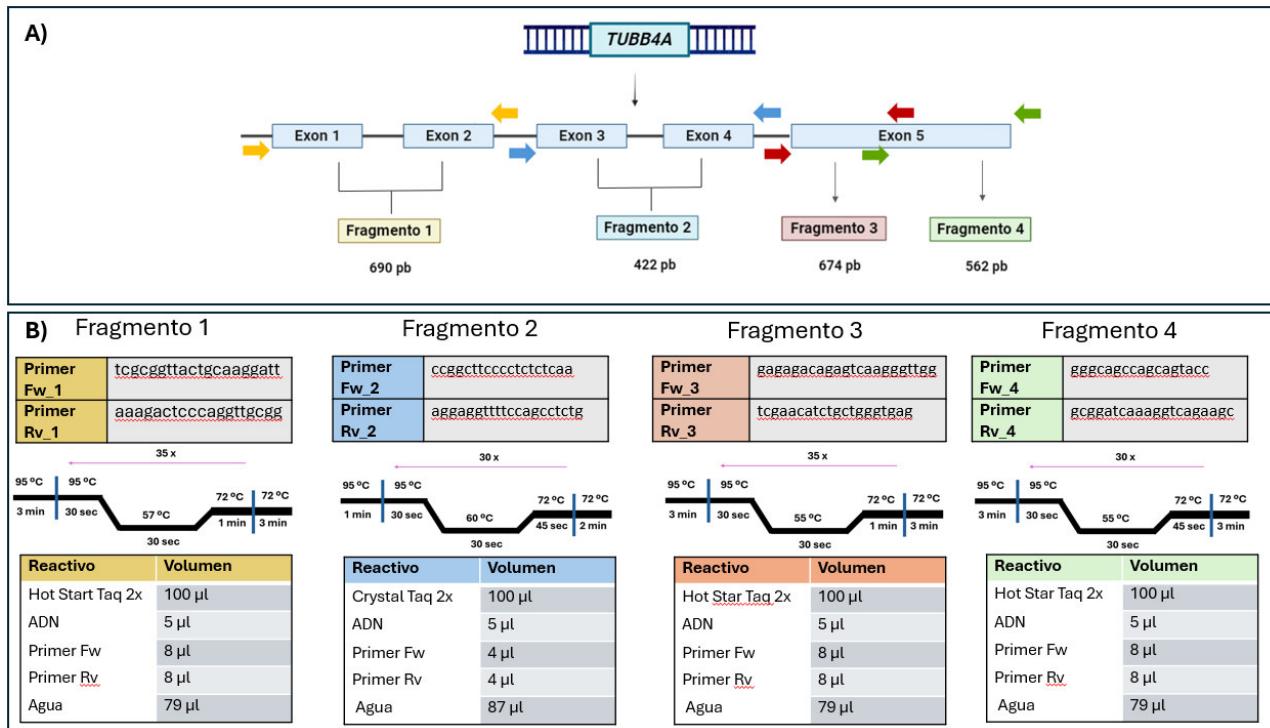


Figura 7. Diseño y condiciones para la amplificación de TUBB4A del paciente. A) Diseño de la amplificación de cinco exones de TUBB4A en cuatro fragmentos. **B)** Se muestra la secuencia nucleotídica de los oligos utilizados, las condiciones en el termociclador y los volúmenes para la PCR de cada fragmento.

Gel de electroforesis

Para que las bandas fueran separadas correctamente y purificar el fragmento del tamaño de interés, se realizaron geles de agarosa al 1% y se corrieron a 100 V por 50 min. Las bandas se purificaron con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, 28704) y se utilizó el marcador 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Cat.No. 10787018).

Cuantificación de muestras

Con el motivo de obtener la cantidad y calidad adecuada de ADN para secuenciación, todas las muestras de PCR purificadas fueron cuantificadas mediante espectrofotometría utilizando cubetas de cuarzo de 100 µl de capacidad. Para cada medición, se preparó una dilución compuesta por 2 µl de ADN y 98 µl de agua libre de nucleasas. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro con el rango de longitud de onda de 230 nm a 290 nm, con especial atención a las absorbancias a 260 nm y 280 nm, utilizadas para calcular la pureza y concentración del ADN.

Secuenciación de muestras de PCR

Con la finalidad de analizar la secuencia de *TUBB4A* del paciente, los fragmentos de ADN de *TUBB4A* obtenidos mediante PCR, se enviaron para secuenciación Sanger al Instituto de Biotecnología (IBT-UNAM) en Cuernavaca, Morelos.

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas obtenidas contra la secuencia *TUBB4A* original (NM_001289127.2) se muestra en la **Figura 8**. Los alineamientos se realizaron con la herramienta Clustal Omega, disponible en la plataforma del European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI).

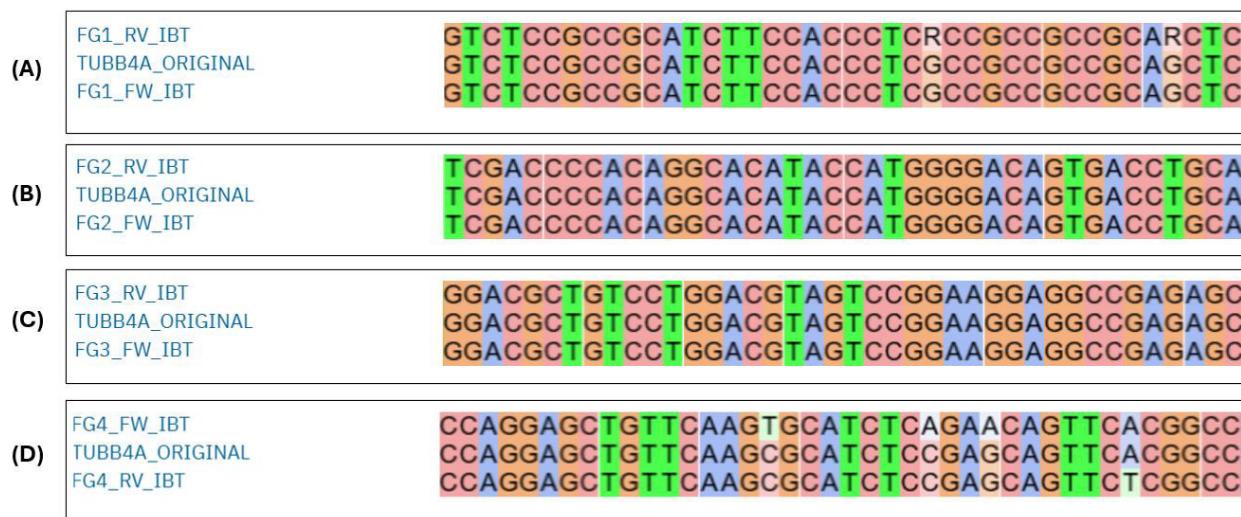


Figura 8. Alineamiento de la secuencia de *TUBB4A* del paciente. Se muestra la secuencia de *TUBB4A* original alineada con la secuencia del paciente del fragmento (A), fragmento 2 (B), fragmento 3 (C) y fragmento 4 (D). Alineamiento obtenido en *Clustal Omega*.

Secuenciación del exoma

Dada la posibilidad de un diagnóstico alternativo, se analizaron otros genes relacionados con tubulinopatías. Para ello, se decidió secuenciar el exoma completo del paciente, lo que nos permite un diagnóstico más preciso. La muestra de ADN fue enviada a la empresa Macrogen (Corea del Sur) para la secuenciación completa del exoma (Whole Exome Sequencing, WES). El análisis de los archivos generados se llevó a cabo mediante el programa Integrative Genomics Viewer (IGV). Esta herramienta permite la visualización simultánea del genoma de referencia y las lecturas obtenidas, facilitando la búsqueda de variantes genéticas.

La región de principal interés fue el gen *TUBB4A*; sin embargo, también se examinaron otros genes pertenecientes a la familia de las tubulinas (*TUBA1A*, *TUBB2A*, *TUBB2B*, *TUBB3B*, *TUBB5*, *TUBG1* y *TUBA8*). Se analizaron también algunos otros genes involucrados en enfermedades del sistema nervioso como posibles diagnósticos diferenciales, como las conexinas (Cx: 36, 30, 47, 29, 43, 32, 45, 26) debido a su asociación con tubulinopatías y trastornos del sistema nervioso central respectivamente.

Cultivo Celular

En busca del estudio de los efectos de las mutaciones en *TUBB4A*, utilizamos cultivos celulares, para evaluar de manera controlada la variante A302T sobre la viabilidad celular.

En nuestros experimentos se utilizó la línea celular HeLa debido a su elevada eficiencia de transfección y a su perfil de expresión génica compatible con nuestros objetivos. De acuerdo con el Human Protein Atlas, esta línea celular presenta un nivel de transcripción de *TUBB4A* de 43.1 nTPM, lo que la hace adecuada para estudios que requieren una expresión constitutiva de esta isoforma de tubulina (“The Human Protein Atlas,” 2025). Para el mantenimiento del cultivo celular usamos Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) suplementado con 100 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y suero fetal bovino a una concentración final de 10%.

Plásmidos

Dado que la enfermedad H-ABC es causada por mutaciones en el gen *TUBB4A*, que codifica para la tubulina beta IV, el uso de plásmidos que expresan tanto la forma silvestre como mutante de este gen permite estudiar los efectos funcionales de dichas mutaciones en un sistema celular controlado. En este proyecto se empleó el plásmido beta IV Tubulin [NM_006087] de la empresa OriGene (Cat. No. RC203945) que expresa la forma silvestre de *TUBB4A* al cual nombraremos a lo largo de este trabajo como **TUBB4A-WT-GFP**. Este se comparó con un plásmido con la misma arquitectura pero que incorpora la mutación A302T al cual nombramos **TUBB4A-A302T-GFP**.

El plásmido beta IV Tubulin contiene la secuencia codificante de *TUBB4A* correspondiente al Human Tagged ORF, fusionada a una proteína fluorescente verde (tGFP) en su extremo (**Figura 9A**), lo que permite su identificación mediante microscopía de fluorescencia. El plásmido que

denominamos TUBB4A-A302T-GFP (**Figura 9B**), contiene la mutación A302T previamente descrita en el modelo murino *taiep* (Duncan et al., 1992; Garduno-Robles et al., 2020). Este constructo se obtuvo por medio de mutagénesis haciendo un cambio puntual de nucleótido de G>A en la posición 1930 en la secuencia de *TUBB4A* (NM_006087) y fue una generosa donación del equipo de investigación de la Dra. Ilane Hernández de la ENES UNAM unidad León.

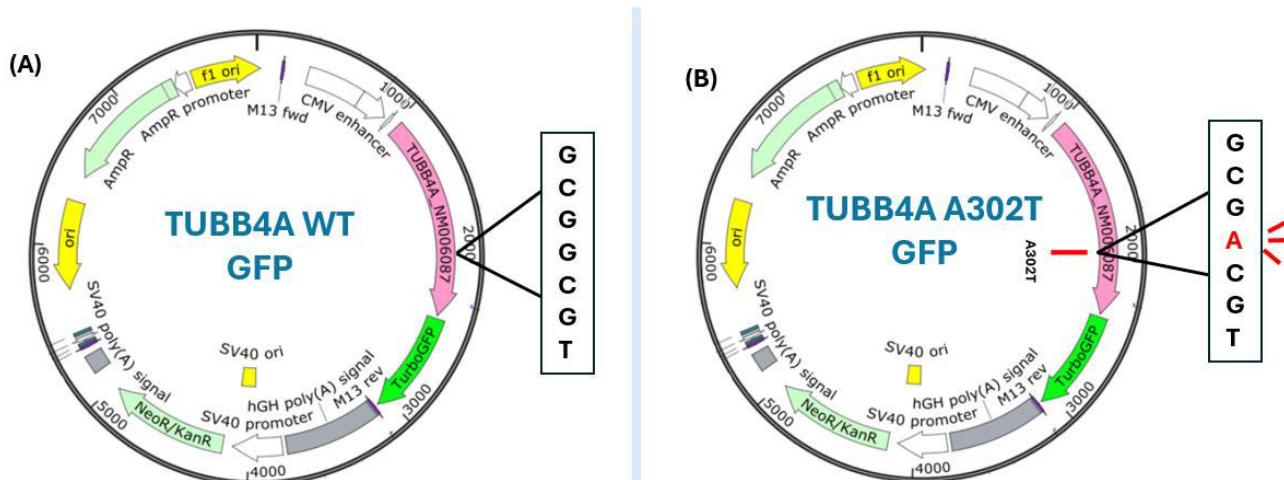


Figura 9. Mapas de los plásmidos TUBB4A-WT-GFP y TUBB4A-A302T-GFP. Se muestran que el gen reportero TurboGFP (verde) se encuentra aguas abajo del ORF de TUBB4A (rosa) en ambos constructos. Además, portan el gen para la resistencia a la ampicilina en *E.coli* y para neomicina para selección de células mamíferas (verde claro). **(A)** Se muestra el mapa del plásmido original sin mutaciones en TUBB4A. **(B)** Plásmido con la mutación A302T, se resalta en el cambio de nucleótido con la letra en color rojo.

Como plásmido control se utilizó el plásmido **iGFP-gamma-actin** de la empresa Addgene (cat.No 231554) el cual codifica para la proteína ACTG1 humana fusionada de manera interna con msfGFP. Esta construcción permite la visualización directa de los filamentos de actina mediante microscopía de fluorescencia, sin interferir significativamente con su función nativa.

Transfección

Con el fin de comparar el efecto de TUBB4A WT contra el efecto de la tubulina mutada (A302T) sobre la viabilidad celular, se llevó a cabo la transfección de células HeLa con los plásmidos previamente descritos, utilizando Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 11668019). Se definieron tres grupos experimentales: 1) un grupo transfectado con el plásmido

TUBB4A.WT-GFP, 2) un grupo con el plásmido mutante TUBB4A-A302T-GFP, y 3) un grupo control transfectado con el plásmido gamma actin.

El protocolo de transfección fue el siguiente: en placas de cultivo de 6 pozos, se colocaron dos cubreobjetos de vidrio estériles por pozo y se sembraron 250,000 células HeLa por pozo en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) y antibióticos. Las células se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 24 horas para permitir su adhesión y proliferación.

Para la preparación del complejo lipofectamina-ADN, en dos tubos Eppendorf de 1.5 ml, se añadieron 50 µl de DMEM sin suero ni antibióticos, en uno de los tubos se incorporaron 3 µl de Lipofectamine 2000, mientras que en el segundo se agregaron 3 µg de ADN plasmídico. Ambas soluciones se incubaron por separado durante 3 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se mezclaron cuidadosamente mediante pipeteo suave. La mezcla resultante se incubó durante 25 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos lipoplexos.

Transcurrido este tiempo, se retiró el medio de cultivo de los pozos y se reemplazó por 1 ml de DMEM simple (sin SFB ni antibióticos). A continuación, se añadió la mezcla de lipofectamina-ADN a cada pozo, se homogenizó cuidadosamente y las células se incubaron durante 12 horas a 37 °C con 5 % de CO₂.

Al cabo de este tiempo, el medio de transfección se sustituyó por DMEM suplementado y las células se incubaron durante 24 horas adicionales a 37 °C con 5 % de CO₂, para permitir la expresión de los constructos plasmídicos.

Tinción con DAPI

Para poder identificar y observar las células de nuestro cultivo, se utilizó la tinción con DAPI. El DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) es un colorante fluorescente ampliamente utilizado en biología celular y molecular para teñir el ADN. Para realizar esta tinción lo primero que se hizo fue agregar 1 ml de formaldehído al 4% por 15 minutos a cada pozo con células. Se retiró la solución y los cubreobjetos se enjuagaron 3 veces con PBS. Se retiró el PBS y se agregó 1 ml de 0.1 % Triton X-100 (Sigma Aldrich, T8787) en PBS por 10 minutos. Se agregó 1 ml de PBS con 1.5 µl de DAPI (Thermo Fisher, 62247) por 10 minutos. Se retiró el medio y se enjuagaron los cubreobjetos 3

veces con PBS. Por último, se colocaron los cubreobjetos sobre medio de montaje (SouthernBiotech, 0100-01) y se dejaron secar. Los cubreobjetos se fijaron con pequeñas gotas de esmalte de uñas transparente sobre laminillas de vidrio.

Ensayo de concentración y viabilidad celular

Con la finalidad de analizar si la mutación A302T, presente en el modelo *taiep*, tiene un efecto tóxico en las células, ya que la mutación A302T como se describió en la sección anterior, tiene un impacto en la dinámica de los microtúbulos, lo cual compromete procesos esenciales de la célula como la división celular. Por lo que se calcularon: 1) la concentración y 2) la viabilidad celular. Para determinar el número de células vivas en una placa de cultivo, se utilizó la técnica de coloración con trypan blue, un colorante que penetra únicamente en células con membrana plasmática comprometida, de esta manera podemos distinguir las células vivas (no marcadas), de las células muertas (marcadas en azul).

Para el conteo de células vivas, se agregaron 20 μ l de trypan blue al 0.4% (GIBCO, 15250061) a 20 μ l de células resuspendidas en 1 ml de DMEM, se tomaron 10 μ l de la mezcla y se colocaron en una cámara de Neubauer y se contaron células vivas y muertas para los tres grupos experimentales. Los cálculos se realizaron con las siguientes fórmulas:

$$\text{Concentración celular} \left(\frac{\text{células}}{\text{ml}} \right) = (\text{promedio de células de los 4 cuadrantes})(FD)(10,000)$$

$$\% \text{ viabilidad celular} = \text{células} \frac{\text{vivas}}{\text{células totales}(\text{vivas} + \text{muertas})} \times 100$$

Imágenes

Las imágenes de las células transfectadas se adquirieron en contraste de fases utilizando un microscopio ZEISS modelo Axio observer A1. Por otro lado, las imágenes de fluorescencia se adquirieron en un microscopio OLYMPUS IX73. Las imágenes se procesaron y analizaron con el software libre FIJI (Schindelin et al., 2012).

Porcentaje de transfección

Se analizaron un total de 25 imágenes por condición experimental (control, TUBB4A-WT-GFP y TUBB4A-A302T-GFP) en un diseño con $n = 4$ réplicas biológicas, lo que resultó en 100 imágenes evaluadas por grupo.

El conteo total de núcleos se realizó utilizando el software FIJI mediante segmentación automatizada. De manera complementaria, el número de células transfectadas se determinó manualmente a partir de las imágenes correspondientes al canal de fluorescencia verde (GFP), ya que la expresión de TUBB4A fluóresce en verde gracias al gen turbo-GFP que se encuentra en el plásmido. A partir de estos datos, se calculó el porcentaje de transfección como la proporción de células fluorescentes respecto al total de núcleos identificados en cada imagen.

Resultados

Diagnóstico clínico de H-ABC de un paciente

Como parte del diagnóstico clínico del paciente, se revisaron imágenes de resonancia magnética cerebral (RM) (**Figura 10**) ya que presentaba signos similares a H-ABC, específicamente presenta retraso psicomotor, déficit sensorial, distonía muscular.

En las resonancias magnéticas no se observaron signos de atrofia cerebelosa, pero sí se identificaron dos de las características más comunes en pacientes que padecen H-ABC, atrofia evidente del cuerpo calloso (**Figura 10A**) y atrofia de los ganglios basales (**Figura 10B**) además de paquigiria. Los hallazgos radiológicos en conjunto con los signos clínicos del paciente son características altamente sugestivas de un proceso neurodegenerativo, lo que refuerza la sospecha diagnóstica de una tubulinopatía, particularmente del tipo H-ABC.

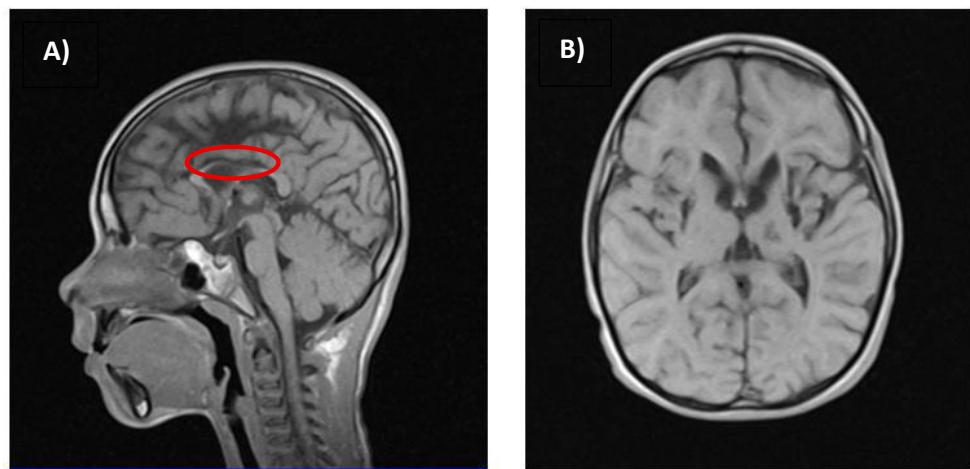


Figura 10. El paciente presenta daño estructural en el cerebro. Imágenes de resonancia magnética de un paciente de 7 años. **A)** Imagen en plano sagital que evidencia atrofia del cuerpo calloso, con un compromiso predominante de su porción superior. **B)** Imagen en plano axial que revela alteraciones estructurales en los ganglios basales. Se observa una pérdida de definición de los límites anatómicos habituales, con una morfología lisa y poco diferenciada. No se logra delimitar claramente la cabeza del núcleo caudado, el globo pálido, el brazo posterior de la cápsula interna ni el tálamo.

Amplificación de *TUBB4A* del paciente

Debido a los resultados encontrados en las resonancias magnéticas del paciente se integró el diagnóstico clínico de la enfermedad H-ABC. Para confirmar o descartar de manera definitiva este diagnóstico, se realizó un estudio genético para identificar si existen mutaciones en la secuencia que codifica para *TUBB4A* en el paciente.

Se obtuvieron las amplificaciones de los cuatro fragmentos que forman la secuencia total de *TUBB4A*. Las imágenes de los geles de electroforesis correspondientes a cada amplificación se presentan en la **Figura 11**. En la sección **(A)** de la figura se muestra la amplificación del fragmento 1 de 690 pb, en la sección **(B)** se muestra la amplificación del fragmento 2 de 442 pb, en la sección **(C)** se muestra la amplificación del fragmento 3 de 684 pb y por último en la sección **(D)** se presenta la amplificación del fragmento 4 de 562 pb.

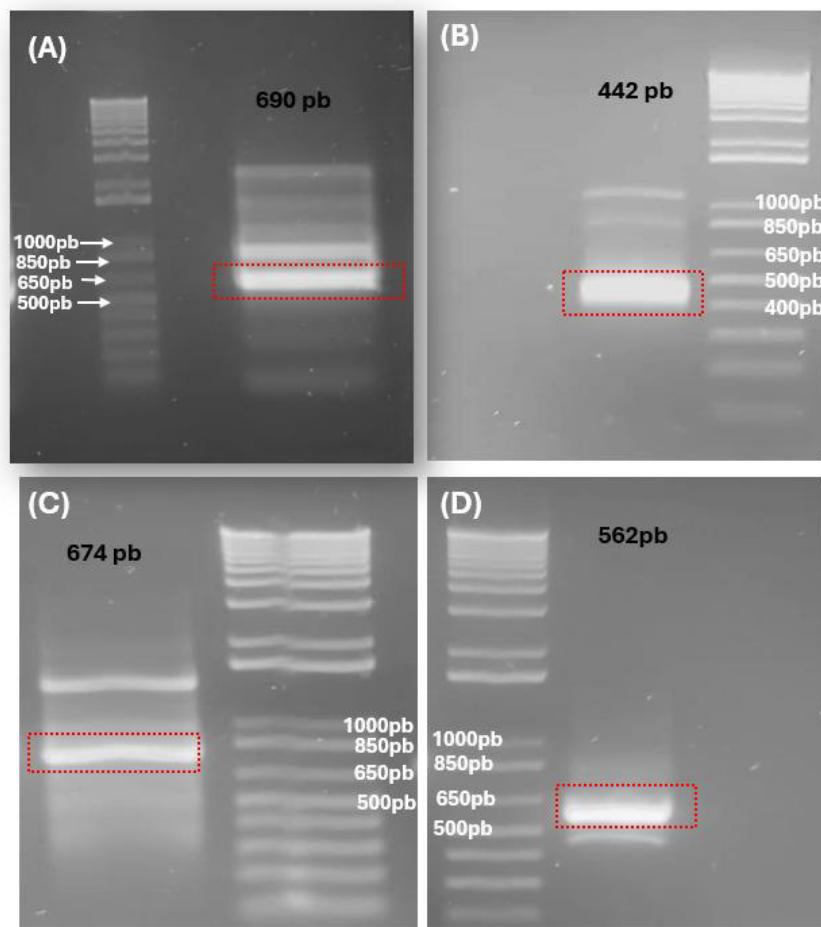


Figura 11. Geles de electroforesis de la amplificación de la secuencia de *TUBB4A* de un paciente con diagnóstico sugestivo de H-ABC. Se muestra el marcador de peso molecular de 1 kb y, para cada uno de los fragmentos, la banda amplificada del tamaño esperado está indicada en el recuadro rojo. **(A)** Amplificación del fragmento 1 de 690 pb. **(B)** Amplificación del fragmento 2 de 442 pb. **(C)** Amplificación del fragmento 3 de 674 pb. **(D)** Amplificación del fragmento 4 de 562 pb.

El paciente presenta una mutación silente en *TUBB4A*

Posterior a la amplificación completa de *TUBB4A* y a la purificación de los fragmentos, se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de cada fragmento de *TUBB4A* del paciente y se alinearon contra una secuencia de referencia de *TUBB4A* (NM_001289127.2). Gracias a esto se identificó una mutación en el fragmento 3. Por lo que el fragmento 3 fue secuenciado en dos instituciones adicionales para comprobar que no se trataba de un error de secuenciación o una falla en la polimerasa. Las dos instituciones adicionales fueron el IPICYT (Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica) y en el UGA-Langebio (Unidad Genómica Avanzada) en

Irapuato. Por lo anterior se confirmó un cambio de nucleótido T<C, como se muestra en la **Figura 12 (A)**.

Mediante el uso del software Jalview, una herramienta bioinformática ampliamente empleada para el análisis, visualización y edición de alineamientos múltiples de secuencias, se llevó a cabo la comparación entre la secuencia de referencia y la secuencia obtenida del paciente en estudio. El análisis reveló que la mutación identificada en la secuencia del paciente corresponde a una mutación silente. Este tipo de mutación se caracteriza por un cambio en la secuencia nucleotídica del ADN pero sin alterar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada (Oelschlaeger, 2024). En este caso específico, se observó que tanto la secuencia de referencia como la variante del paciente continúan codificando para una valina en la posición 258, como se puede observar en la **Figura 12 (B)**. Lo que puede sugerir que esta mutación probablemente no tiene un efecto directo sobre la función proteica ni sobre la conformación estructural de la tubulina beta-4A.

No obstante, es importante considerar que, aunque las mutaciones silentes tradicionalmente no causan una manifestación fenotípica de la enfermedad, en investigaciones recientes han demostrado que en ciertos contextos pueden afectar la expresión génica, el empalme del ARN mensajero (*splicing*), la estabilidad del ARN o la velocidad de traducción, por lo que no deben ser descartadas a priori en estudios funcionales posteriores (Rahaman et al., 2023; Shen et al., 2022; Supek, 2016).

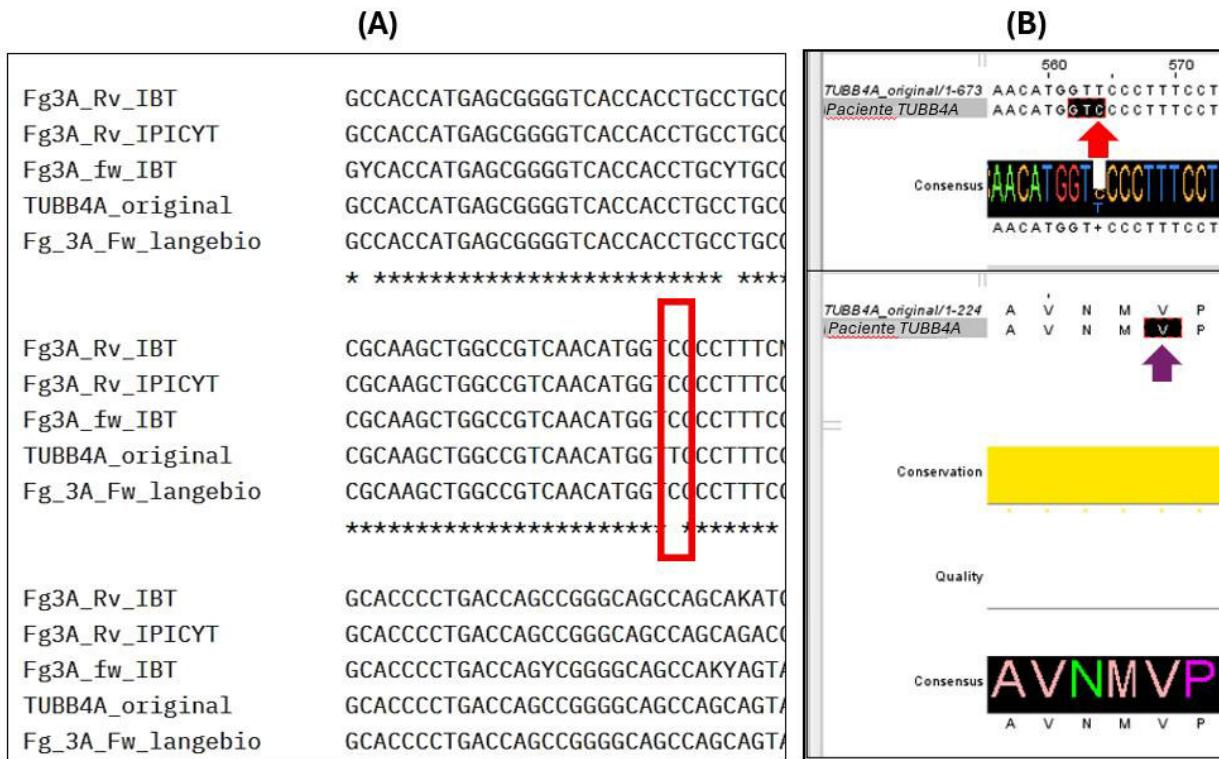


Figura 12. Identificación de mutación silente en *TUBB4A* del paciente. (A) Se muestra un alineamiento múltiple de secuencias del fragmento 3 de *TUBB4A* del paciente y se resalta en un recuadro rojo la mutación puntual T<C. (B) Se muestra la secuencia nucleotídica del fragmento 3 de *TUBB4A* del paciente y se señala la sección mutada con la flecha roja y con la flecha morada se muestra la traducción de aminoácidos de la sección mutada, la cual codifica para una valina.

Con el objetivo de evaluar el posible impacto clínico de la variante Val258, se consultaron bases de datos especializadas en variantes genéticas humanas, como gnomAD (Genome Aggregation Database), que recopilan información sobre polimorfismos y su frecuencia en poblaciones diversas. Se encontró que esta variante corresponde a un polimorfismo clasificado como benigno (**Figura 13**), es decir, no se ha asociado con enfermedad ni con consecuencias funcionales relevantes a nivel proteico (gnomAD, 2025; Lopez-Juarez et al., 2021).

En gnomAD, la variante se ha detectado en 1,128,068 alelos analizados y presenta una frecuencia alélica global de 69.3 % en gnomAD (2025), lo que la clasifica como una variante común. Esta alta frecuencia poblacional respalda su clasificación como una variante no patogénica, descartando su implicación directa en el fenotipo clínico del paciente estudiado.

Variant ID	Source	HGVS Consequence	VEP Annotation	Germline classification	Allele Count	Allele Number	Allele Frequency	Number of Homozygotes
19-6495722-G-C	E G	p.Pro259Pro	● synonymous	Uncertain significance	8	1613988	4.96e-6	0
19-6495725-A-G	E G	p.Val258Val	● synonymous	Benign	1118068	1613922	6.93e-1	390001
19-6495731-G-A	E	p.Asn256Asn	● synonymous		1	1614114	6.20e-7	0
19-6495737-G-A	E G	p.Ala254Ala	● synonymous	Benign/Likely benign	335	1614128	2.08e-4	4

Figura 13. La variante Val258Val es un polimorfismo benigno frecuente. Se presenta una tabla obtenida de Genome Aggregation Database que muestra el número de alelos, la frecuencia alélica y el número de homocigotos para cada variante en *TUBB4A*. La frecuencia alélica de Val258Val es alta, lo que indica que es una variante común entre la población.

Secuenciación del Exoma del paciente

Dado que no se identificaron variantes patogénicas en *TUBB4A*, se procedió a realizar la secuenciación del exoma completo del paciente, con el objetivo de explorar otros genes pertenecientes a la familia de las tubulinas y que se han implicado en un espectro diverso de tubulinopatías.

Se detectaron dos variantes: una sustitución C>G en el gen *TUBG1*, que afecta una arginina en la posición 343, y una variante C>T en el gen *TUBA8*, que involucra una asparagina en la posición 300 (**Tabla 1**). No obstante, ambas mutaciones corresponden a variantes silentes, ya que no producen un cambio en la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas. Por lo tanto, se descarta el diagnóstico presuntivo de tubulinopatía en este caso.

Proteína	Gen	Mutación	Aminoácido
Tubulina 4A	<i>TUBB4A</i>	GUU- GUC	Val258
Tubulina 1A	<i>TUBA1A</i>	X	X
Tubulina 2A	<i>TUBB2A</i>	X	X
Tubulina 2B	<i>TUBB2B</i>	X	X
Tubulina 3	<i>TUBB3</i>	X	X
Tubulina 5	<i>TUBB5</i>	X	X
Tubulina G1	<i>TUBG1</i>	CGC- CGG	Arg343
Tubulina alfa 8	<i>TUBA8</i>	AAC- AAU	Asn300

Tabla 1. Análisis de distintos genes de tubulina. Se identificaron mutaciones silentes en genes que codifican para isoformas de tubulina asociadas con tubulinopatías. Las posiciones mutadas se indican en rojo.

En relación con los genes de interés para nuestro grupo de investigación, se optó por analizar particularmente aquellos que codifican para conexinas implicadas en la comunicación intercelular neuronal en el sistema nervioso central. Se identificaron dos variantes silentes. La primera corresponde a una sustitución C>T en el gen que codifica la conexina 36 (GJD2), que afecta un codón para serina en la posición 196. La segunda, una mutación G>C en el gen de la conexina 45 (GJC1), localizada en un codón para prolina en la posición 259 (**Tabla 2**).

Adicionalmente, se identificó una mutación no silenciosa en el gen GJB2, que codifica para la conexina 26, una proteína integrante de las uniones gap crucial en el mantenimiento de la homeostasis iónica en el oído interno. Esta variante consiste en la sustitución del aminoácido valina por isoleucina en la posición 27 de la proteína (p.Val27Ile).

Las mutaciones en GJB2 han sido ampliamente asociadas con sordera neurosensorial no sindrómica autosómica recesiva (DFNB1), representando una de las causas genéticas más frecuentes de pérdida auditiva congénita a nivel mundial (Kelley et al., 1998). Sin embargo, la variante identificada en este estudio ha sido previamente descrita en la literatura científica y catalogada en bases de datos genómicas como ClinVar como un polimorfismo benigno con alta frecuencia alélica en diversas poblaciones sanas (Choi et al., 2011; Zheng et al., 2015).

Por lo tanto, a pesar de tratarse de una mutación que implica un cambio de aminoácido, su clasificación como variante no patogénica sugiere que no está implicada en el fenotipo clínico del paciente evaluado.

Proteína	Gen	Mutación	Aminoácido
Cx 26	GJB2	GUC- AUC	Val27Ile
Cx 36	GJD2	UCC- UCU	Ser196
Cx 30	GJC1	x	x
Cx 47	GJC2	x	x
Cx 29	GJC3	x	x
Cx 43	GJA1	x	x
Cx 32	GJB1	x	x
Cx45	GJD3	CCG- CCC	Pro259

Tabla 2. Análisis de distintos genes de conexinas. Se identificó un polimorfismo benigno en la conexina 26. En **rojo** se muestran las secuencias mutadas de diferentes conexinas.

Transfección de plásmidos

Antes de realizar transfecciones con los plásmidos de interés, verificamos la eficiencia del método de transfección usando plásmidos reporteros que usamos de rutina en nuestro laboratorio: Venus y dos plásmidos que marcan proteínas del citoesqueleto (PAC gamma actin-cherry y PAC gamma actin-cherry). En la **Figura 14** se pueden observar micrografías de fluorescencia de células transfectadas con dichos plásmidos, este resultado revela que el protocolo que se utilizó para este proyecto permite la transfección de distintos plásmidos en células HeLa de manera eficiente.

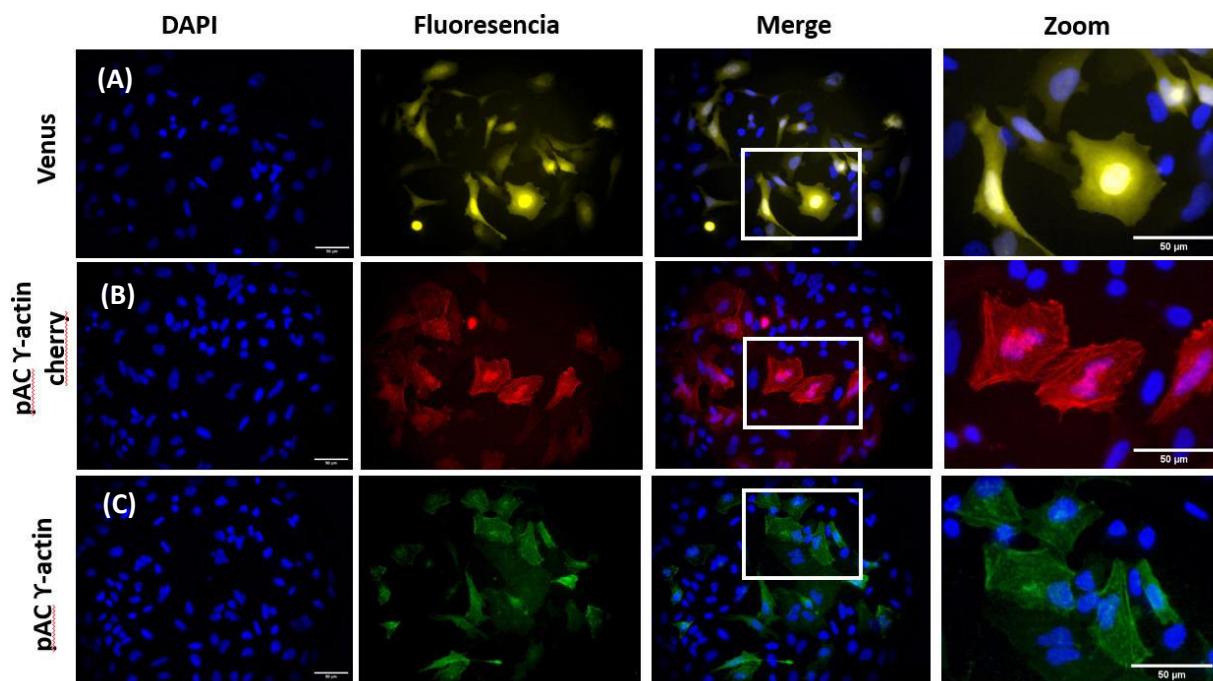


Figura 14. Expresión de proteínas Venus y actina después de la transfección. Imágenes de Fluorescencia de núcleos (azul), actina (verde y rojo), venus (amarillo) 24 hrs después de la transfección. Se observa la expresión de la actina en filamentos largos y definidos a comparación de la expresión homogénea del marcador citoplasmático. Escala: 50 μ m.

Una vez que se estandarizó el protocolo de transfección, el siguiente resultado que se obtuvo fue la expresión de nuestro gen de interés. Para analizar si la expresión de TUBB4A afecta la viabilidad de las células se comparó el número de células vivas que expresan TUBB4A WT GFP 24 hrs después de la transfección, un grupo de células transfectadas con un plásmido que porta el gen de la gamma actina, descrito en el resultado anterior como control positivo y con un grupo de células sin transfectar como control negativo. Al comparar el patrón de expresión de ambas proteínas en imágenes de fluorescencia se puede observar que la actina, se expresa en filamentos

gruesos a lo largo del citoplasma, mientras que TUBB4A se observa la presencia del halo de luz en la región perinuclear.

La expresión de TUBB4A marcada en verde en la región perinuclear la cual corresponde a una mayor densidad de microtúbulos alrededor del centrosoma, estructura que actúa como el centro organizador de microtúbulos en las células. La expresión de TUBB4A en dicha región se resalta con una flecha blanca en el zoom de la **Figura 15 (C)**. A partir de esta región perinuclear, se visualiza la extensión radial de microtúbulos como filamentos largos y definidos que se proyectan hacia la periferia del citoplasma. La intensidad de fluorescencia disminuye gradualmente en las regiones distales, lo que refleja una menor densidad o separación de los microtúbulos en esas zonas, señalado con la flecha roja en el zoom de la **Figura 15 (C)**.

Estos hallazgos son consistentes con la localización esperada de microtúbulos en células y confirman la correcta expresión y visualización de la proteína TUBB4A en células HeLa.

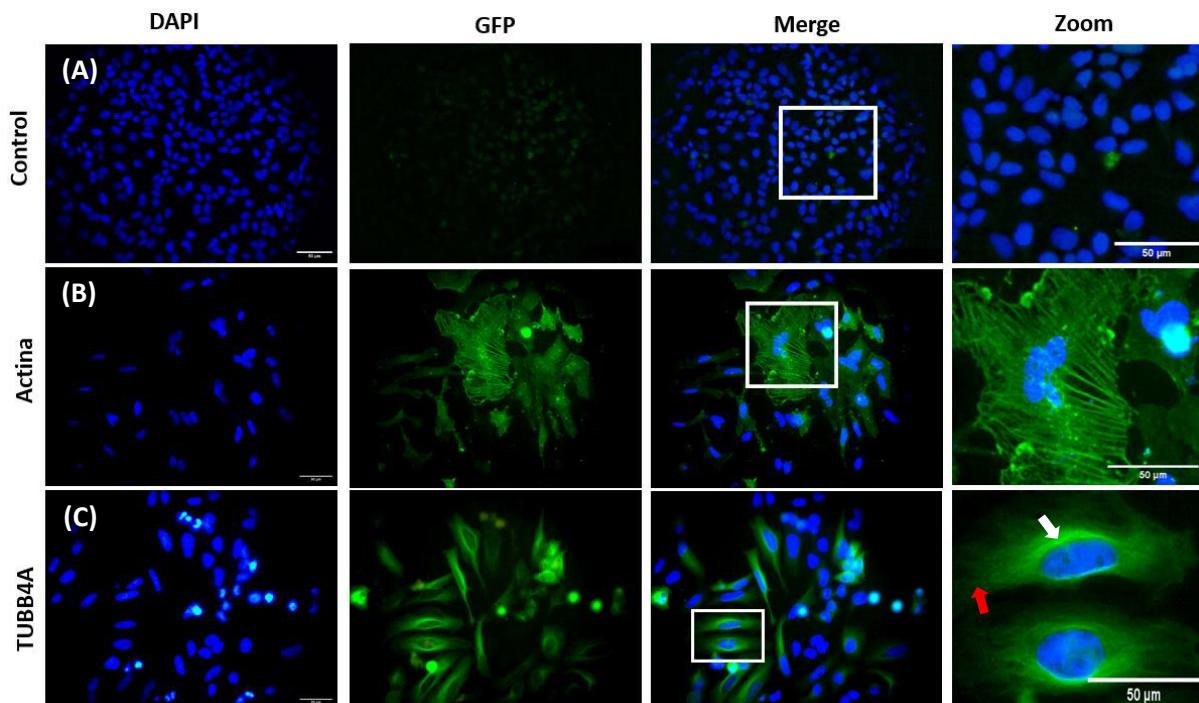


Figura 15. Expresión de TUBB4A-GFP en células HeLa. Imágenes de fluorescencia de núcleos (azul) y de TUBB4A (verde). La expresión de TUBB4A muestra una morfología de filamentos largos y definidos que se acumulan alrededor del núcleo (flecha blanca) y se extienden por el citoplasma de la célula (flecha roja). Escala: 50 μ m.

Por otro lado, la expresión de TUBB4A-A302T-GFP en las células transfectadas, se observa distribuido de manera similar en el citoplasma y en la región perinuclear (**Figura 16C**) y es muy semejante al que presenta la TUBB4A-WT-GFP(**Figura 16D**). Estas observaciones sugieren que la mutación A302T no modifica el patrón de expresión de dicha proteína.

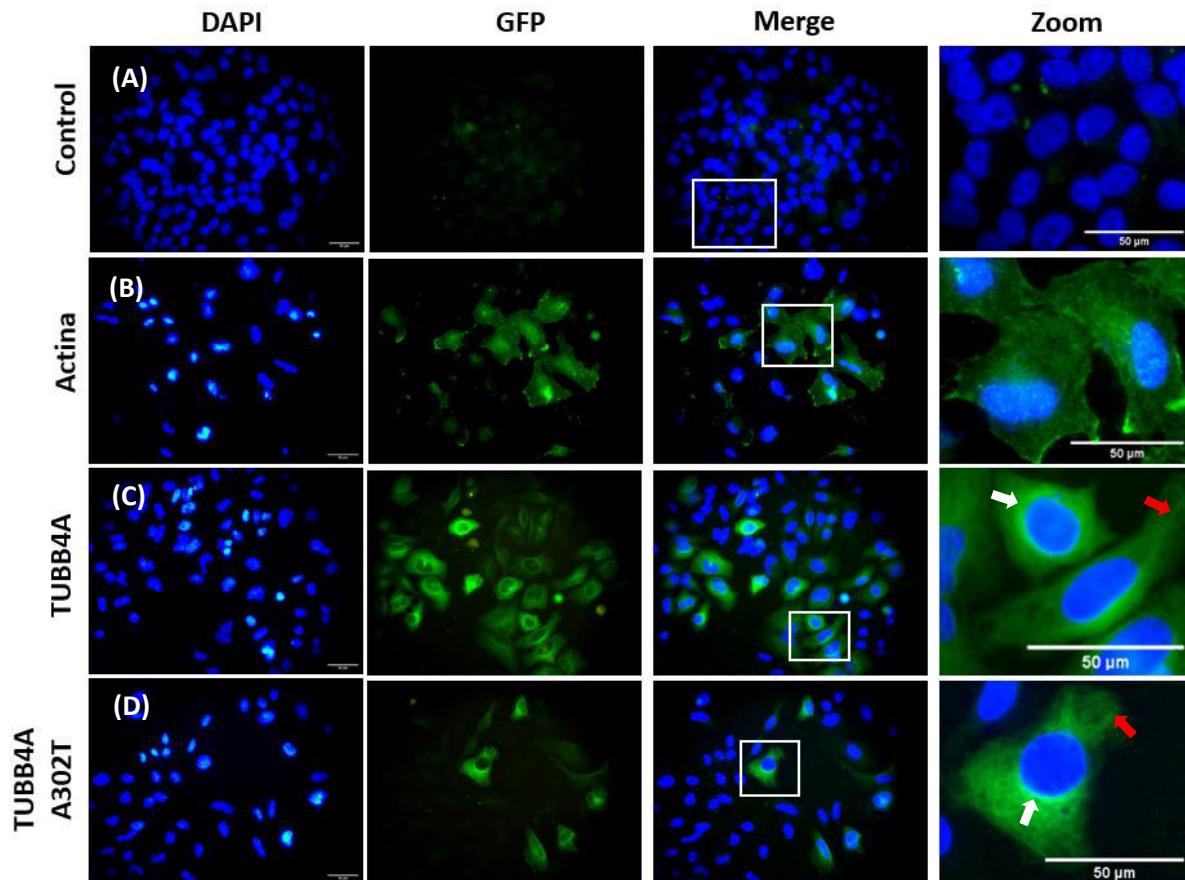


Figura 16. Expresión de TUBB4A WT GFP y TUBB4A A302T GFP en células HeLa. Imágenes de fluorescencia de núcleos (azul) y tubulina beta 4A (verde). Se observa un patrón similar de expresión en verde de TUBB4A A302T-GFP respecto a TUBB4A-GFP. Ambas proteínas muestran una expresión con morfología de filamentos largos y definidos que forman un halo intenso alrededor del núcleo (Flecha blanca) y se extienden por el citoplasma de la célula (flecha roja). Escala 50 μ m.

La TUBB4A A302T afecta el porcentaje de transfección

Al cuantificar el número de células que expresan TUBB4A-A302T-GFP comparada con el número de células por campo, se obtuvo un porcentaje de 12.25%, mientras que aquellas que expresan

TUBB4A-WT-GFP es de 27%. El análisis estadístico de estos datos muestra una diferencia significativa entre el porcentaje de transfección de TUBB4A mutada respecto al control (**Figura 17**).

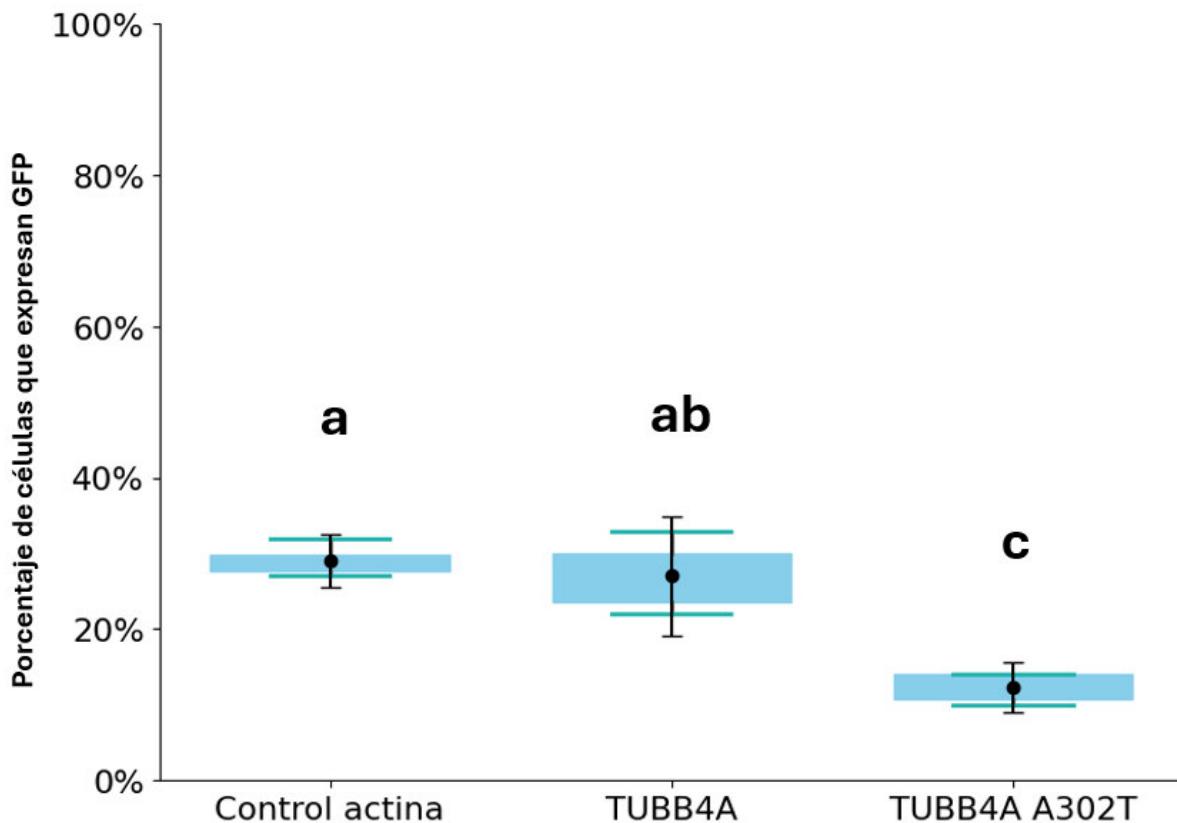


Figura 17. La diferencia de porcentaje de transfección entre TUBB4A WT y TUBB4A A302T fue significativa. Se muestra la boxplot de la diferencia de los porcentajes de transfección del grupo control, TUBB4A WT y mutada respectivamente. Se analizaron los datos por el método Mann-Whitney con una $N=4 \pm$ SEM, los resultados que muestran diferencia significativa en la gráfica se marcaron con letras diferentes y presentan una $p \leq 0.05$, letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

Estos resultados podrían indicar un efecto funcional de la mutación A302T sobre la dinámica de microtúbulos o sobre la homeostasis proteica, aunque se requerirán estudios adicionales para confirmar estos mecanismos.

Para tratar de proporcionar elementos que nos ayuden a entender este efecto analizamos la proliferación y la viabilidad celular.

Con el fin de analizar si la transfección de TUBB4A-A302T-GFP afecta la proliferación celular, se midió la concentración celular en tres condiciones: células control transfectado con iGFP-gamma-actin, células transfectadas con TUBB4A-WT-GFP y células transfectadas con TUBB4A-A302T-GFP. Esta comparación permitió evaluar si la variante de TUBB4A impacta en la densidad celular respecto a las condiciones control y silvestre. Se encontró que no hay diferencias estadísticamente significativas en la concentración celular total entre los grupos control, TUBB4A WT y TUBB4A A302T (**Figura 18**), lo que puede indicar que la mutación en TUBB4A no está teniendo un efecto tóxico que afecte la proliferación de las células HeLa. La diferencia entre las desviaciones estándar mostradas en la **Figura 18** puede deberse a variaciones en el método de conteo.

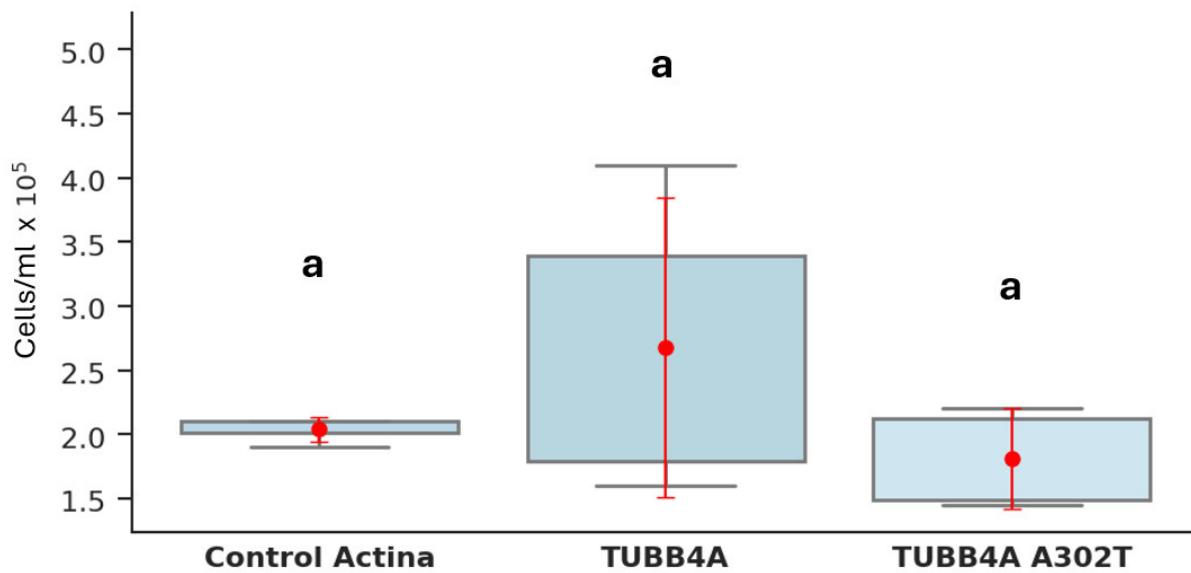


Figura 18. La transfección no afecta la proliferación celular. La boxplot muestra que no hay diferencias en la concentración celular entre los grupos. N=4 +/- SEM. Por el método de Kruskal-Wallis, letras iguales indican que no hay diferencia significativa. (ns).

Para evaluar el efecto de la transfección con TUBB4A-A302T sobre la supervivencia de las células, se determinó la viabilidad celular. Ya que la mutación A302T como se describió anteriormente,

tiene un impacto en la estructura y función de los microtúbulos, lo cual compromete procesos esenciales como el transporte intracelular, la división celular y la estabilidad del citoesqueleto.

Se observó que la diferencia en el porcentaje de viabilidad celular entre el grupo transfectado con TUBB4A-A302T 72% y el grupo control negativo 86% fue estadísticamente significativa. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre el porcentaje de viabilidad de TUBB4A WT 77% respecto al grupo control y a TUBB4A mutada, como lo muestra la **Figura 19**.

Estos datos sugieren que la mutación puntual A302T no compromete la homeostasis celular en las condiciones experimentales empleadas.

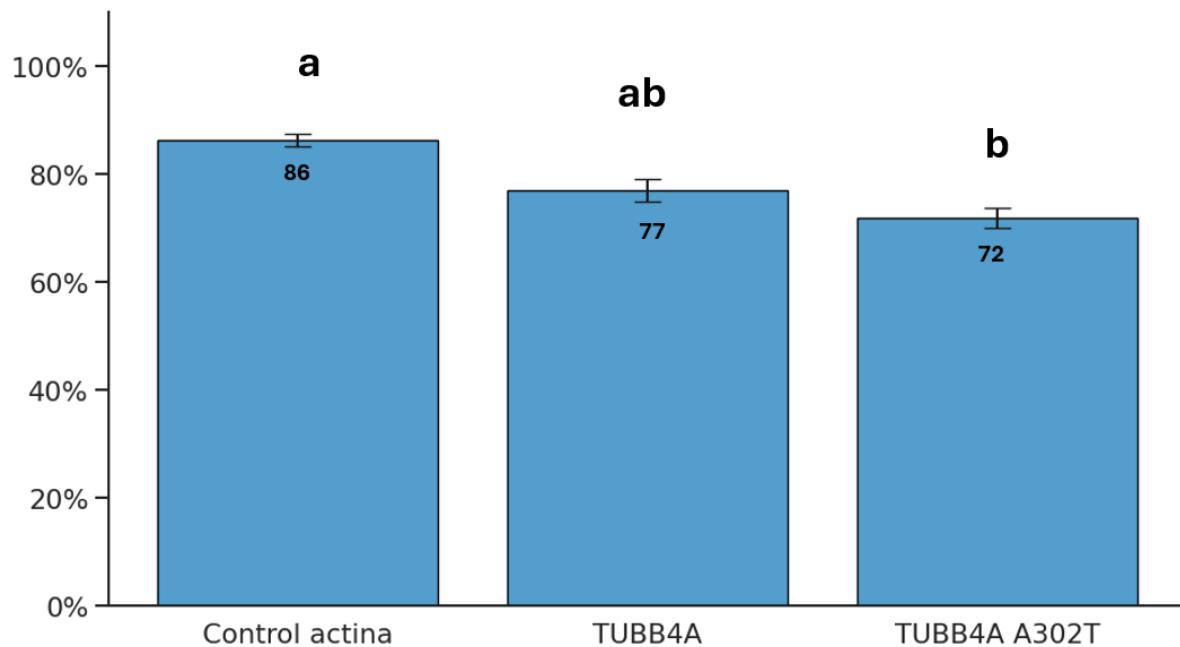


Figura 19. La viabilidad celular se ve afectada por la transfección con TUBB4A-A302T-GFP. Se muestran imágenes de contraste de fases del cultivo celular post-transfección. Se muestra la gráfica de barras que indica la diferencia entre las medias de los porcentajes de viabilidad celular entre los grupos experimentales. Se analizaron los datos por el método Kruskal-Wallis con una $N=4$ +/- SEM, los resultados que muestran diferencia significativa en la gráfica se marcaron con letras diferentes y presentan una $p\leq 0.05$, letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

Discusión

El presente estudio aborda el análisis clínico y genético de un paciente con diagnóstico presuntivo de Hipomielinización con Atrofia de ganglios Basales y Cerebelo (H-ABC), una enfermedad causada principalmente por mutaciones en el gen *TUBB4A*. Los hallazgos de este trabajo contribuyen al entendimiento de las tubulinopatías, al analizar variantes genéticas como posibles causas patogénicas, y al explorar experimentalmente los efectos celulares de la mutación A302T en un modelo *in vitro*.

Importancia del análisis de variantes genéticas

El diagnóstico clínico inicial del paciente estuvo respaldado por observaciones radiológicas características de H-ABC, como atrofia del cuerpo calloso y alteraciones en ganglios basales. Sin embargo, la confirmación genética es indispensable para establecer un diagnóstico definitivo y para descartar otras enfermedades con fenotipos superpuestos. Por lo que el análisis de *TUBB4A* permitió identificar una mutación silente (Val258Val), la cual fue confirmada en diferentes instituciones y validada como variante benigna mediante bases de datos poblacionales como gnomAD, donde se reporta con una frecuencia alélica elevada. Estos resultados refuerzan la importancia de considerar la evidencia poblacional al interpretar variantes genéticas en enfermedades, pues la alta frecuencia de esta mutación en personas sanas descarta su papel como causa del fenotipo clínico observado en el paciente.

Mutaciones silentes: más allá de lo “benigno”

Aunque la variante Val258Val fue clasificada como no patogénica, el estudio de mutaciones silentes resulta relevante en el campo de la biología molecular. En años recientes se ha demostrado que algunas variantes silentes pueden afectar procesos como la estabilidad del ARN, la eficiencia de traducción o el splicing alternativo (Shen et al., 2022; Supek, 2016). Estos mecanismos sugieren que incluso mutaciones que no modifican la secuencia de aminoácidos podrían contribuir a la variabilidad fenotípica observada en enfermedades monogénicas. Esta variabilidad sugiere la participación de factores genéticos adicionales, como variantes modificadoras en genes relacionados con la mielinización, el citoesqueleto o la respuesta celular al estrés. Además, mecanismos epigenéticos, incluyendo la metilación del ADN, modificaciones

de histonas y la acción de ARN no codificantes, podrían desempeñar un papel crucial en la regulación de la expresión de *TUBB4A* y otros genes implicados en la homeostasis neuronal (Attwood et al., 2002; Dhar et al., 2021; Dong and Weng, 2013; Karlić et al., 2010). La heterogeneidad epigenética entre distintos tipos celulares o estados de desarrollo podría explicar diferencias en la severidad y progresión de la enfermedad, incluso entre individuos con la misma mutación (Pehlivan et al., 2024; Shen et al., 2022).

Si bien en este caso no encontramos evidencia de un efecto adverso causado por la mutación silente, nuestros resultados resaltan la necesidad de no descartar automáticamente esta clase de mutaciones en estudios diagnósticos. Comprender estos mecanismos es esencial para avanzar hacia una medicina personalizada, que permita predecir el curso clínico y diseñar estrategias terapéuticas adaptadas al perfil genético y epigenético de cada paciente.

Secuenciación del exoma y hallazgos adicionales

Al no encontrar mutaciones relevantes en *TUBB4A*, la secuenciación del exoma completo (WES) permitió descartar la presencia de variantes patogénicas en otros genes asociados a tubulinopatías. Se identificaron mutaciones silentes en *TUBG1* y *TUBA8*, así como en variantes de genes que codifican para la expresión de conexinas. Pero ninguna que esté asociada a alguna enfermedad o síndrome. Aunque algunas de las mutaciones silentes encontradas en *TUBG1*, *TUBA8* y *GJD2* (Cx 36) han sido descritas en la literatura (Broad Institute, 2025; Yuen et al., 2019), su clasificación como polimorfismos benignos respalda que el fenotipo clínico del paciente no se relaciona directamente con estas variantes. El hallazgo de una mutación no sinónima en *GJB2* (Cx 26) (p.Val27Ile), previamente descrita como variante benigna (Choi et al., 2011), refuerza la importancia de realizar un análisis crítico de variantes monogénicas en las bases de datos, evitando conclusiones prematuras.

Análisis funcional de la mutación A302T

Un aporte central de este trabajo fue la evaluación experimental *in vitro* de la mutación A302T en *TUBB4A*, previamente descrita en el modelo murino *taiep* (Alata et al., 2021; Duncan et al., 1992b). A diferencia de la variante sinónima encontrada en el paciente, esta mutación ha sido asociada con alteraciones en la dinámica de microtúbulos (Duncan et al., 1992; Garduno-Robles

et al., 2020). Nuestros resultados mostraron que el patrón fibrilar de la expresión de TUBB4A con localización perinuclear y extensión radial de microtúbulos a lo largo del citoplasma celular, no interfiere de manera evidente en la formación de la red microtubular por la mutación A302T.

No obstante, el análisis cuantitativo mostró que el porcentaje de transfección es significativamente menor en las células transfectadas con el vector que expresa TUBB4A-A302T-GFP, sugiriendo que esta mutación podría influir en la eficiencia de expresión o en la estabilidad de TUBB4A.

La mutación A302T en TUBB4A no induce efectos significativos en la proliferación celular, ni en la viabilidad celular. Estos resultados refuerzan la necesidad de realizar estudios adicionales y más específicos, como MTT, que es un ensayo colorimétrico para medir viabilidad celular y actividad metabólica que permitan confirmar si la mutación A302T compromete efectivamente la homeostasis celular, como: ensayo de resazurina (Alamar Blue), citometría de flujo con exclusión de propidio, Ensayo de ATP (CellTiter-Glo) o el método de tinción con Etidio Homodímero-1 (EthD-1).

Limitaciones del estudio

Entre las limitaciones de este trabajo destaca el uso de una línea celular no neuronal (HeLa), que, aunque presenta niveles adecuados de expresión de TUBB4A, no refleja completamente la complejidad del sistema nervioso central. Asimismo, los ensayos se realizaron en condiciones basales, por lo que no se evaluaron posibles efectos bajo estrés celular o durante procesos dinámicos como la división o diferenciación neuronal. Futuros estudios en modelos celulares más especializados, como neuronas derivadas de células madre inducidas, podrían aportar información más relevante para la fisiopatología de H-ABC.

Conclusión

En conjunto, los resultados de este trabajo destacan la importancia de combinar el análisis clínico, genético y funcional en el estudio de enfermedades neurodegenerativas poco descritas como H-ABC. La confirmación de que la variante sinónima Val258Val es un polimorfismo benigno descarta su implicación en el fenotipo clínico del paciente, mientras que el análisis experimental de la mutación A302T aporta evidencia sobre su posible impacto en la viabilidad celular. Estos hallazgos refuerzan la necesidad de un enfoque multidisciplinario para interpretar variantes genéticas.

Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo abren diversas líneas de investigación que pueden contribuir al fortalecimiento del conocimiento sobre enfermedades neurodegenerativas poco descritas, como la H-ABC. En primer lugar, se destaca la necesidad de ampliar el análisis funcional de la mutación A302T en distintos modelos celulares, complementándolo con la aplicación de pruebas más sensibles para evaluar la viabilidad celular. Asimismo, los datos presentados constituyen un punto de partida para el estudio del comportamiento de los microtúbulos mediante técnicas de microscopía avanzada, con el propósito de descartar una posible acumulación o disminución de estas estructuras asociadas a variantes patogénicas de **TUBB4A**.

En relación con el diagnóstico genético del paciente, los hallazgos obtenidos representan un llamado a la comunidad médica para profundizar en el conocimiento de este tipo de enfermedades raras. Además, para nuestra línea de investigación, constituyen un avance significativo hacia el desarrollo de pruebas diagnósticas más eficientes, que permitan mejorar la identificación y caracterización de variantes genéticas relevantes en patologías neurodegenerativas.

Referencias

1. Abdollahi, M.R., Morrison, E., Sirey, T., Molnar, Z., Hayward, B.E., Carr, I.M., Springell, K., Woods, C.G., Ahmed, M., Hattingh, L., Corry, P., Pilz, D.T., Stoodley, N., Crow, Y., Taylor, G.R., Bonthon, D.T., Sheridan, E., 2009. Mutation of the Variant α -Tubulin TUBA8 Results in Polymicrogyria with Optic Nerve Hypoplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 85, 737–744. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.10.007>
2. Alata, M., González-Vega, A., Piazza, V., Kleinert-Altamirano, A., Cortes, C., Ahumada-Juárez, J.C., Eguibar, J.R., López-Juárez, A., Hernandez, V.H., 2021. Longitudinal Evaluation of Cerebellar Signs of H-ABC Tubulinopathy in a Patient and in the taiep Model. *Front. Neurol.* 12, 702039. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.702039>
3. Attwood, J.T., Yung, R.L., Richardson, B.C., 2002. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell. Mol. Life Sci. CMS* 59, 241–257. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8420-z>
4. Bahi-Buisson, N., Maillard, C., 2016. Tubulinopathies Overview.
5. Bahi-Buisson, N., Poirier, K., Fourniol, F., Saillour, Y., Valence, S., Lebrun, N., Hully, M., Fallet Bianco, C., Boddaert, N., Elie, C., Lascelles, K., Souville, I., LIS-Tubulinopathies Consortium, Beldjord, C., Chelly, J., 2014. The wide spectrum of tubulinopathies: what are the key features for the diagnosis? *Brain* 137, 1676–1700. <https://doi.org/10.1093/brain/awu082>
6. Broad Institute, 2025. gnomAD.
7. Cai, S., Li, J., Wu, Y., Jiang, Y., 2020. De Novo mutations of TUBB2A cause infantile-onset epilepsy and developmental delay. *J. Hum. Genet.* 65, 601–608. <https://doi.org/10.1038/s10038-020-0739-5>
8. Chakraborti, S., Natarajan, K., Curiel, 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. <https://doi.org/10.1002/cm.21290>
9. Chen, H., Lin, Z., Arnst, K., Miller, D., Li, W., 2017. Tubulin Inhibitor-Based Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Molecules* 22, 1281. <https://doi.org/10.3390/molecules22081281>
10. Choi, S.-Y., Lee, K.Y., Kim, H.-J., Kim, H.-K., Chang, Q., Park, H.-J., Jeon, C.-J., Lin, X., Bok, J., Kim, U.-K., 2011. Functional Evaluation of GJB2 Variants in Nonsyndromic Hearing Loss. *Mol. Med.* 17, 550–556. <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00183>
11. Curiel, J., Rodríguez Bey, G., Takanohashi, A., Bugiani, M., Fu, X., Wolf, N.I., Nmezi, B., Schiffmann, R., Bugaighis, M., Pierson, T., Helman, G., Simons, C., Van Der Knaap, M.S., Liu, J., Padiath, Q., Vanderver, A., 2017. TUBB4A mutations result in specific neuronal and oligodendrocytic defects that closely match clinically distinct phenotypes. *Hum. Mol. Genet.* 26, 4506–4518. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx338>
12. Desai, A., Mitchison, T.J., 1997. MICROTUBULE POLYMERIZATION DYNAMICS. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 83–117. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.83>

13. Dhar, G.A., Saha, S., Mitra, P., Nag Chaudhuri, R., 2021. DNA methylation and regulation of gene expression: Guardian of our health. *The Nucleus* 64, 259–270. <https://doi.org/10.1007/s13237-021-00367-y>
14. Dong, X., Weng, Z., 2013. The Correlation Between Histone Modifications and Gene Expression. *Epigenomics* 5, 113–116. <https://doi.org/10.2217/epi.13.13>
15. Duncan, I.D., Bugiani, M., Radcliff, A.B., Moran, J.J., Lopez-Anido, C., Duong, P., August, B.K., Wolf, N.I., Van Der Knaap, M.S., Svaren, J., 2017. A mutation in the *Tubb4a* gene leads to microtubule accumulation with hypomyelination and demyelination. *Ann. Neurol.* 81, 690–702. <https://doi.org/10.1002/ana.24930>
16. Duncan, I.D., Lunn, K.F., Holmgren, B., Urba-Holmgren, R., Brignolo-Holmes, L., 1992a. The taeip rat: A myelin mutant with an associated oligodendrocyte microtubular defect. *J. Neurocytol.* 21, 870–884. <https://doi.org/10.1007/BF01191684>
17. Duncan, I.D., Lunn, K.F., Holmgren, B., Urba-Holmgren, R., Brignolo-Holmes, L., 1992b. The taeip rat: A myelin mutant with an associated oligodendrocyte microtubular defect. *J. Neurocytol.* 21, 870–884. <https://doi.org/10.1007/BF01191684>
18. Farache, D., Emorine, L., Haren, L., Merdes, A., 2018. Assembly and regulation of γ -tubulin complexes. *Open Biol.* 8, 170266. <https://doi.org/10.1098/rsob.170266>
19. Garduno-Robles, A., Alata, M., Piazza, V., Cortes, C., Eguibar, J.R., Pantano, S., Hernandez, V.H., 2020. MRI Features in a Rat Model of H-ABC Tubulinopathy. *Front. Neurosci.* 14, 555. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00555>
20. gnomAD, 2025. gnomAD: Variante 19-6495725-A-G en el gen TUBB4A [WWW Document]. URL https://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000104833?dataset=gnomad_r4
21. Gonçalves, F.G., Freddi, T.D.A.L., Taranath, A., Lakshmanan, R., Goetti, R., Feltrin, F.S., Mankad, K., Teixeira, S.R., Hanagandi, P.B., Arrigoni, F., 2018. Tubulinopathies. *Top. Magn. Reson. Imaging* 27, 395–408. <https://doi.org/10.1097/rmr.0000000000000188>
22. Hamilton, E.M., Polder, E., Vanderver, A., Naidu, S., Schiffmann, R., Fisher, K., Raguž, A.B., Blumkin, L., H-ABC Research Group, Van Berkel, C.G.M., Waisfisz, Q., Simons, C., Taft, R.J., Abbink, T.E.M., Wolf, N.I., Van Der Knaap, M.S., 2014. Hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum: further delineation of the phenotype and genotype–phenotype correlation. *Brain* 137, 1921–1930. <https://doi.org/10.1093/brain/awu110>
23. Hebebrand, M., Hüffmeier, U., Trollmann, R., Hehr, U., Uebe, S., Ekici, A.B., Kraus, C., Krumbiegel, M., Reis, A., Thiel, C.T., Popp, B., 2019. The mutational and phenotypic spectrum of TUBA1A-associated tubulinopathy. *Orphanet J. Rare Dis.* 14. <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1020-x>
24. Karlić, R., Chung, H.-R., Lasserre, J., Vlahoviček, K., Vingron, M., 2010. Histone modification levels are predictive for gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 2926–2931. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909344107>

25. Kelley, P.M., Harris, D.J., Comer, B.C., Askew, J.W., Fowler, T., Smith, S.D., Kimberling, W.J., 1998. Novel Mutations in the Connexin 26 Gene (GJB2) That Cause Autosomal Recessive (DFNB1) Hearing Loss. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 792–799. <https://doi.org/10.1086/301807>
26. Kollman, J.M., Merdes, A., Mourey, L., Agard, D.A., 2011a. Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 709–721. <https://doi.org/10.1038/nrm3209>
27. Kollman, J.M., Merdes, A., Mourey, L., Agard, D.A., 2011b. Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 709–721. <https://doi.org/10.1038/nrm3209>
28. Krajka, V., Vulinovic, F., Genova, M., Tanzer, K., Jijumon, A.S., Bodakuntla, S., Tennstedt, S., Mueller-Fielitz, H., Meier, B., Janke, C., Klein, C., Rakovic, A., 2022. H-ABC– and dystonia-causing *TUBB4A* mutations show distinct pathogenic effects. *Sci. Adv.* 8, eabj9229. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj9229>
29. Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D., Dombrowski, Y., 2019. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells* 8, 1424. <https://doi.org/10.3390/cells8111424>
30. Lopez-Juarez, A., Gonzalez-Vega, A., Kleinert-Altamirano, A., Piazza, V., Garduno-Robles, A., Alata, M., Villaseñor-Mora, C., Eguibar, J.R., Cortes, C., Padierna, L.C., Hernandez, V.H., 2021. Auditory impairment in H-ABC tubulinopathy. *J. Comp. Neurol.* 529, 957–968. <https://doi.org/10.1002/cne.24990>
31. Maillard, C., Roux, C.J., Charbit-Henrion, F., Steffann, J., Laquerriere, A., Quazza, F., Buisson, N.B., 2023. Tubulin mutations in human neurodevelopmental disorders. *Semin. Cell Dev. Biol.* 137, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.07.009>
32. Mitchison, T., Kirschner, M., 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237–242. <https://doi.org/10.1038/312237a0>
33. Nave, K.-A., 2010. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468, 244–252. <https://doi.org/10.1038/nature09614>
34. Ngo, L., Haas, M., Qu, Z., Li, S.S., Zenker, J., Teng, K.S.L., Gunnersen, J.M., Breuss, M., Habgood, M., Keays, D.A., Heng, J.I.-T., 2014. TUBB5 and its disease-associated mutations influence the terminal differentiation and dendritic spine densities of cerebral cortical neurons. *Hum. Mol. Genet.* 23, 5147–5158. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu238>
35. Nick, P., 2017. Membranes of unification. *Protoplasma* 254, 1–2. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1050-3>
36. Oelschlaeger, P., 2024. Molecular Mechanisms and the Significance of Synonymous Mutations. *Biomolecules* 14, 132. <https://doi.org/10.3390/biom14010132>
37. Pehlivan, D., Bengtsson, J.D., Bajikar, S.S., Grochowski, C.M., Lun, M.Y., Gandhi, M., Jolly, A., Trostle, A.J., Harris, H.K., Suter, B., Aras, S., Ramocki, M.B., Du, H., Mehaffey, M.G., Park, K., Wilkey, E., Karakas, C., Eisfeldt, J.J., Pettersson, M., Liu, L., Shinawi, M.S., Kimonis, V.E., Wiszniewski, W., Mckenzie, K., Roser, T., Vianna-Morgante, A.M., Cornier, A.S., Abdelmoity, A., Hwang, J.P., Jhangiani, S.N., Muzny, D.M., Mitani, T., Muramatsu, K., Nabatame, S., Glaze, D.G., Fatih, J.M., Gibbs, R.A., Liu, Z., Lindstrand, A., Sedlazeck, F.J., Lupski, J.R., Zoghbi, H.Y., Carvalho,

- C.M.B., 2024. Structural variant allelic heterogeneity in MECP2 duplication syndrome provides insight into clinical severity and variability of disease expression. *Genome Med.* 16, 146. <https://doi.org/10.1186/s13073-024-01411-7>
38. Poirier, K., Lebrun, N., Broix, L., Tian, G., Saillour, Y., Boscheron, C., Parrini, E., Valence, S., Pierre, B.S., Oger, M., Lacombe, D., Geneviève, D., Fontana, E., Darra, F., Cances, C., Barth, M., Bonneau, D., Bernadina, B.D., N'Guyen, S., Gitiaux, C., Parent, P., des Portes, V., Pedespan, J.M., Legrez, V., Castelnau-Ptakine, L., Nitschke, P., Hieu, T., Masson, C., Zelenika, D., Andrieux, A., Francis, F., Guerrini, R., Cowan, N.J., Bahi-Buisson, N., Chelly, J., 2013. Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat. Genet.* 45, 639–647. <https://doi.org/10.1038/ng.2613>
39. Rahaman, S., Faravelli, S., Voegeli, S., Becskei, A., 2023. Polysome propensity and tunable thresholds in coding sequence length enable differential mRNA stability. *Sci. Adv.* 9, eadh9545. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adh9545>
40. Roostalu, J., Surrey, T., 2017. Microtubule nucleation: beyond the template. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 702–710. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.75>
41. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9(7), 676–682. <https://doi.org/doi:10.1038/nmeth.2019>
42. Schröter, J., Döring, J.H., Garbade, S.F., Hoffmann, G.F., Kölker, S., Ries, M., Syrbe, S., 2021. Cross-sectional quantitative analysis of the natural history of TUBA1A and TUBB2B tubulinopathies. *Genet. Med.* 23, 516–523. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-01001-z>
43. Sferra, A., Bertini, E., Haase, G., 2023. Editorial: Tubulinopathies: fundamental and clinical challenges. *Front. Cell. Neurosci.* 17, 1296958. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1296958>
44. Shen, X., Song, S., Li, C., Zhang, J., 2022. Synonymous mutations in representative yeast genes are mostly strongly non-neutral. *Nature* 606, 725–731. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04823-w>
45. Sibello Deustua, S., Hernández Perugorría, A., Méndez Sánchez, T. de J., Pons Castro, L., Naranjo Fernández, R.M., 2022. Fibrosis congénita de los músculos extraoculares. *Rev. Cuba. Oftalmol.* 35.
46. Simons, C., Wolf, N.I., McNeil, N., Caldovic, L., Devaney, J.M., Takanohashi, A., Crawford, J., Ru, K., Grimmond, S.M., Miller, D., Tonduti, D., Schmidt, J.L., Chudnow, R.S., van Coster, R., Lagae, L., Kisler, J., Sperner, J., van der Knaap, M.S., Schiffmann, R., Taft, R.J., Vanderver, A., 2013. A De Novo Mutation in the β -Tubulin Gene TUBB4A Results in the Leukoencephalopathy Hypomyelination with Atrophy of the Basal Ganglia and Cerebellum. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 767–773. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.03.018>
47. Supek, F., 2016. The Code of Silence: Widespread Associations Between Synonymous Codon Biases and Gene Function. *J. Mol. Evol.* 82, 65–73. <https://doi.org/10.1007/s00239-015-9714-8>

48. The Human Protein Atlas, 2025. . TUBB4A Gene. URL https://www.proteinatlas.org/ENSG00000104833-TUBB4A/subcellular?utm_source=chatgpt.com#rna
49. Van Der Knaap, M.S., Naidu, S., Pouwels, P.J., Bonavita, 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*, .*American journal of neuroradiology* 23.
50. Weizmann Institute of Science, s.f. GeneCards The Human Gene Database. TUBB4A Gene-GeneCards TUBB4A Protein. URL <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TUBB4A>
51. Yuen, Y.T.K., Guella, I., Roland, E., Sargent, M., Boelman, C., 2019. Case reports: novel TUBG1 mutations with milder neurodevelopmental presentations. *BMC Med. Genet.* 20, 95. <https://doi.org/10.1186/s12881-019-0827-6>
52. Zheng, J., Ying, Z., Cai, Z., Sun, D., He, Z., Gao, Y., Zhang, T., Zhu, Y., Chen, Y., Guan, M.-X., 2015. GJB2 Mutation Spectrum and Genotype-Phenotype Correlation in 1067 Han Chinese Subjects with Non-Syndromic Hearing Loss. *PLOS ONE* 10, e0128691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128691>

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



León, Gto., 20 de noviembre del 2025.

Dr. Modesto Sosa Aquino
Director de la División de Ciencias e Ingenierías
Campus León
Universidad de Guanajuato

Dr. Modesto Sosa Aquino:

Por medio de la presente, informo a usted que he leído el manuscrito de tesis de la estudiante de la Maestría en Ciencias Aplicadas de la DCI, Lic. en CA Aurora Citlalli Montes Centeno, la cual lleva por título: "ANALISIS IN VITRO DE MUTACIONES GENETICAS DE UNA ENFERMEDAD NEURODEGENERATIVA".

Después de haber realizado mis comentarios, la estudiante realizó las correcciones pertinentes. Por lo anterior doy mi consentimiento para que Aurora Citlalli Montes Centeno, defienda de manera oral su tesis de Maestría en la fecha que sus directores de tesis juzguen conveniente.

Sin más por el momento, y agradeciendo las atenciones a la presente, me despido enviando un cordial saludo.

ATENTAMENTE

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Lazo de la Vega".

Dra. María Luisa Lazo de la Vega Monroy
Profesora Titular B de TC

**CAMPUS LEÓN, DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS**

20 DE ENERO No. 929, Col. Obregón
León, Guanajuato, México; C, P.:37320
Teléfono: 01(477)143812 ext. 4683
www.uqro.mx/campusleon
mlazo@uqro.mx



Dr. Modesto Sosa Aquino
Director de la División de Ciencias e Ingenierías
Campus León
Universidad de Guanajuato

León, Gto., 20 de noviembre del 2025.

Dr. Modesto Sosa Aquino:

Por medio de la presente, informo a usted que he leído el manuscrito de tesis de la estudiante de la Maestría en Ciencias Aplicadas de la DCI, Lic. en CA Aurora Citlalli Montes Centeno, la cual lleva por título: "ANALISIS IN VITRO DE MUTACIONES GENETICAS DE UNA ENFERMEDAD NEURODEGENERATIVA".

Después de haber realizado mis comentarios, el estudiante realizó las correcciones pertinentes. Por lo anterior doy mi consentimiento para que Aurora Citlalli Montes Centeno, defienda de manera oral su tesis de Maestría en la fecha que sus directores de tesis juzguen conveniente.

Sin más por el momento, y agradeciendo las atenciones a la presente, me despido enviando un cordial saludo.

Atentamente:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Silvia Margarita Avila Flores".

Dr. Silvia Margarita Avila Flores
Profesor

División de Ciencias e Ingenierías
Campus León
Loma del Bosque 103, Col. Lomas del Campestre, León, Gto., CP 37000
Tel. (477) 788 5100 ext. 8493
www.dci.ugto.mx



DR. MODESTO SOSA AQUINO

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍAS CAMPUS LEÓN

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

PRESENTE

Por medio de la presente, informo a usted que he leído el manuscrito de tesis de la estudiante de la Maestría en Ciencias Aplicadas de la DCI, Lic. en CA Aurora Citlalli Montes Centeno, la cual lleva por título: “Análisis *in vitro* de mutaciones genéticas de una enfermedad neurodegenerativa”.

Después de haber realizado mis comentarios, el estudiante realizó las correcciones pertinentes. Por lo anterior doy mi consentimiento para que Aurora Citlalli Montes Centeno, defienda de manera oral su tesis de Maestría en la fecha que sus directores de tesis juzguen conveniente.

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un atento y cordial saludo.

Atentamente

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

León de los Aldama, Guanajuato, a 21 de noviembre de 2025.

Jefa de la División de Estudios de Posgrado e Investigación en Ciencias Multidisciplinarias

DRA. ILANE HERNÁNDEZ MORALES



Cima
Universidad
de Navarra

Pamplona, España, a 14 de noviembre de 2025

Asunto: Revisión de tesis de Maestría en Ciencias Aplicadas

DR. MODESTO ANTONIO SOSA AQUINO
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍAS
CAMPUS LEÓN
UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

Respetable Dr. Sosa:

Por medio de la presente, me permito informarle que he sido designada como miembro del jurado para el examen de grado de la Maestría en Ciencias Aplicadas de la estudiante Aurora Citlalli Montes Centeno. En este sentido, comunico que he revisado su tesis titulada:

"ANÁLISIS IN VITRO DE MUTACIONES GENÉTICAS DE UNA ENFERMEDAD NEURODEGENERATIVA"

Después de dialogar con la estudiante acerca de las observaciones derivadas de dicha revisión, considero que la tesis cumple con los requisitos necesarios para que la Srita. Aurora pueda continuar con los trámites administrativos para solicitar su examen de grado.

Agradezco su atención y le envío un cordial saludo.

Atentamente,

M.C.A. María de los Ángeles Garduño Robles
Estudiante de Doctorado en Medicina Aplicada y Biomedicina
Terapia génica para encefalopatías congénitas
Centro de Investigación Médica Aplicada
Av. Pío XX 55, Pamplona 31008, España
mgardunorob@alumni.unav.es