



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Biológicas

Licenciatura en Biología

Instituto de Fisiología

**Estandarización de un método de extracción de ADN a partir de
muestras de pacientes sanos**

Tesis para obtener el título de Licenciado en Biología

Presenta: C. Brandon Ortiz Pérez

Directora de tesis: Dra. Claudia Mancilla Simbro

Codirector: Dr. Alberto Ramírez Mata

Primavera 2025

Puebla Pue. México

Agradecimientos

Esta tesis de licenciatura no habría sido posible sin el apoyo invaluable de muchas personas. En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi familia, especialmente a mi madre, Alma Delia Pérez Puga y a mi padre Lázaro Ortiz Chepetla, quienes siempre me aconsejaron, me motivaron a seguir adelante y me brindaron su respaldo a lo largo de toda mi carrera profesional.

Extiendo también mi gratitud a mis hermanos, amigos y colegas, quienes, con sus consejos y apoyo constante, estuvieron presentes en cada etapa de mi formación académica y profesional.

Una mención especial merece mi abuelita, Isabel Chepetla Cabrera, quien es una figura fundamental en mi trayectoria académica. Su apoyo incondicional fue clave para alcanzar los logros que hoy celebro.

Agradezco el apoyo de mi directora de tesis la Dra. Claudia Mancilla Simbro y Codirector al Dr. Alberto Ramírez Mata, por el conocimiento y dedicación absoluta en mi formación como Biólogo, gracias.

Finalmente, agradezco profundamente a mi pareja, Ana Patricia Pérez Claro y a mi hija-gato, Brócoli, quienes estuvieron a mi lado en todo el proceso de titulación y conclusión de la carrera. Ellas conocen mejor que nadie los desafíos que enfrenté y fueron un pilar de fortaleza y motivación en cada momento de este camino.

Índice de contenido

Resumen	7
Introducción.....	9
Antecedentes.....	15
Justificación.....	19
Planteamiento del problema	20
Hipótesis.....	21
Objetivos.....	22
Objetivos generales.....	¡Error! Marcador no definido.
Objetivos específicos.....	¡Error! Marcador no definido.
Material y métodos	23
Material.....	23
Metodología.....	23
Resultados.....	30
Diseño de primers.....	35
Extracción de ADN-genómico	¡Error! Marcador no definido.
Discusión	38
Referencias	42

Índice de tablas

Tabla 1. Comparación entre conos y bastones	11
Tabla 2. Volúmenes de los componentes para realizar la PCR con los primers Rcbtb1E3-E4.	28
Tabla 3. Condiciones de la PCR para los primers Rcbtb1E3-E4.....	29
Tabla 4. Mutaciones reportadas en la literatura de RCBTB1 asociadas a enfermedad.	30
Tabla 5. Primers diseñados para la amplificación de las 2 regiones de interés del gen RCBTB1 dentro del ADN genómico.....	36

Índice de figuras

Figura 1. Capas del tejido en el ojo humano.	9
Figura 2. Componentes celulares de la retina.....	10
Figura 3. Modelado de RCBTB1 en Chimera.	14
Figura 4. Ubicación de mutaciones en RCBTB1 asociadas a enfermedad.....	18
Figura 5. Metodología para la toma de muestras.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 6. Metodología para la extracción de ADN genómico.....	27
Figura 7. Ubicación de las distintas mutaciones encontradas en RCBTB1.	33
Figura 8. Gen completo de RCBTB1. Se identificaron las regiones de cada exón dentro del gen.	34
Figura 9. Gen RCBTB1 con las regiones a amplificar por los 2 pares de primers diseñados.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 10. Revelación de geles de electroforesis de la extracción de ADN con distintas metodologías.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 11. PCR con primers Rcbtb1E3-E4.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 12. PCR modificando parámetros-E4.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 13. PCR usando nueva alícuota de primers.	¡Error! Marcador no definido.

Índice de abreviaturas

RCBTB1: broad complex-tramtrack-bric-a-brac.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

gADN: ácido desoxirribonucleico genómico.

mRNA: ácido ribonucleico mensajero.

RNA: ácido ribonucleico.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

IRD: enfermedades hereditarias de la retina.

RP: retinitis pigmentosa.

EPR: células del epitelio pigmentado de la retina.

ROS: reactivos de oxígeno.

PBS: amortiguador de fosfato o amortiguador de fosfato salino.

TAE: tris acetato.

FERV: vitreorretinopatía exudativa familiar.

AAV: vectores de virus adeno-asociados.

Resumen

El ojo humano es uno de los órganos más importante del cuerpo, el cual, es responsable de la visión, permite conocer el espacio temporal del entorno. El ojo se compone de diferentes estructuras especializadas que permiten el paso de la luz y convertirla en ondas electromagnéticas que viajan al cerebro para su interpretación, una de estas importantes estructuras es la retina de la cual está compuesta por distintos tipos celulares, de los cuales los más importantes e estudiados son los fotorreceptores, las cuales son células capaces de convertir la energía de la luz en energía eléctrica. Las distrofias de retina son un grupo de enfermedades genéticas hereditarias que afectan a la retina ocasionando daño parcial o permanente a los fotorreceptores, cada vez más estas enfermedades afectan a un mayor número de la población mundial, ocasionando pérdida de la visión de manera permanente. Actualmente, se conocen varios genes y mecanismos genéticos que ocasionan estas enfermedades de distrofia en retina, gran parte, de estos estudios se han llevado a cabo en diferentes partes del mundo como Asia y Europa, en Latinoamérica hay investigaciones importantes, pero aún falta realizar investigaciones en comunidades específicas de personas con alguna discapacidad visual, como en México. Por lo cual, en el proyecto de tesis se planteó investigar alteraciones del gen RCBTB1, el producto de este gen es un dominio N-terminal RCC1 y un dominio C-terminal BTB, cual participa de manera importante en la vida media de los fotorreceptores de retina, cuya actividad es similar a un regulador de condensación cromosómica adicional, también, participa en la regulación del ciclo celular mediante la remodelación de la cromatina, de igual forma, puede funcionar como un supresor tumoral regulando las vías de daño/repación del ADN y de apoptosis. Han reportado, en distintos trabajos la existencia de múltiples mutaciones en el gen RCBTB1, que induce provoca una disminución en los niveles de mRNA y como consecuencia ocasiona afectación en el funcionamiento de las células epiteliales pigmentarias y fotorreceptoras de la retina, que a su vez provocan distrofia visual. El análisis de este gen es crucial para conocer uno de los factores genéticos que inducen distrofias de retina en la población mexicana. Para ello, se desarrollo y estandarizo una metodología para obtener muestras de pacientes sanos, para obtener el gADN, a partir de muestras sanguíneas (suero y linfocitos) y de células de la saliva, se realizó una PCR para la amplificación y se verifico por medio de una electroforesis la presencia de RCBTB1. Por lo cual, se concluye que uno de los métodos más óptimos para la

identificación del gen RCBTB1, es por medio de muestras de células de saliva, en consiguiendo los mejores resultados. Por lo tanto, este método es más factible dado que las muestras que se obtienen, es por un medio no invasivo y el paciente no presenta algún síntoma de estrés.

Introducción

Los ojos toman información sobre lo que los rodea, enviando señales al cerebro para ver las formas, los colores, la textura y el movimiento. El procesamiento de imágenes es un procedimiento complejo; comienza cuando la luz entra al ojo, esta es reflejada por la córnea y centrada en la retina dónde la señal de luz es traducida en potenciales de acción que se procesan en el cerebro, dando así la percepción visual. La retina es una estructura neuronal que recubre la parte posterior del ojo que es responsable de la visión, está constituida por fotorreceptores, células horizontales, células bipolares, células amacrinas, células ganglionares y células de Müller, Figura 1 (Talib & Boon, 2020). En la retina ocurre la cascada de transducción visual; se absorbe la luz, los fotones se convierten en señales que describen la información visual y la información es enviada al cerebro (Grossniklaus et al., 2015)

L. Tian et al. / Genomics 105 (2015) 253–264

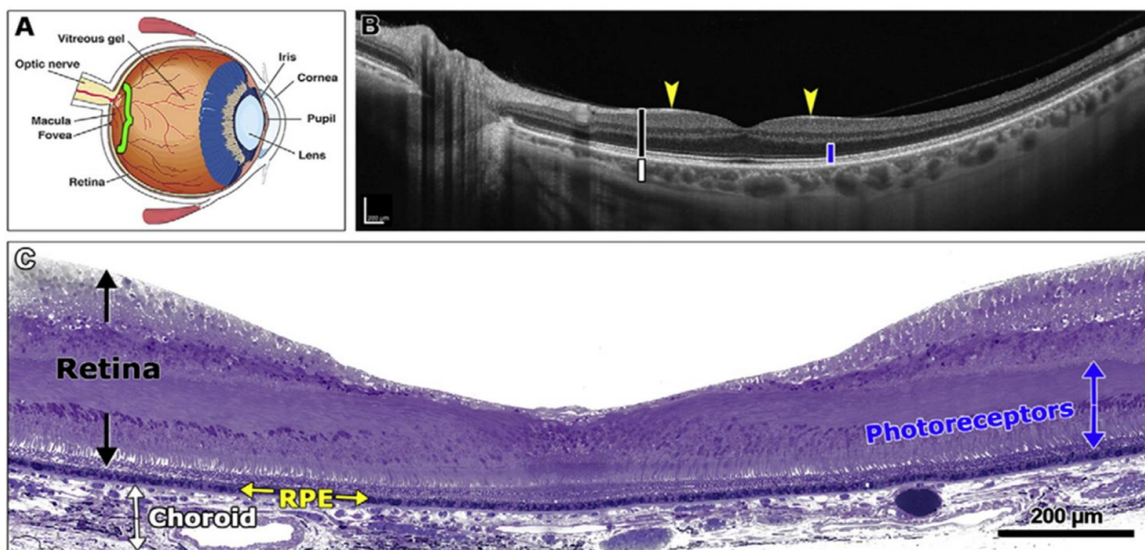


Figura 1. Capas del tejido en el ojo humano. A – Sección transversal del ojo. B- Imágenes de alta resolución in vivo de una retina humana normal. C – Histología de alta resolución de la fovea (Tian et al., 2015).

La mayor parte de la visión está mediada por los fotorreceptores de la retina, estos se clasifican en dos tipos los conos y bastones cada uno con diferentes características y funciones, ubicadas de manera única hacia la cara posterior de las subcapas de la retina (Figura 2). En los segmentos externos de los fotorreceptores están compuestos por una pila

de discos membranosos en los que están incrustadas las moléculas clave para la captura de fotones (Kawamura & Tachibanaki, 2008).

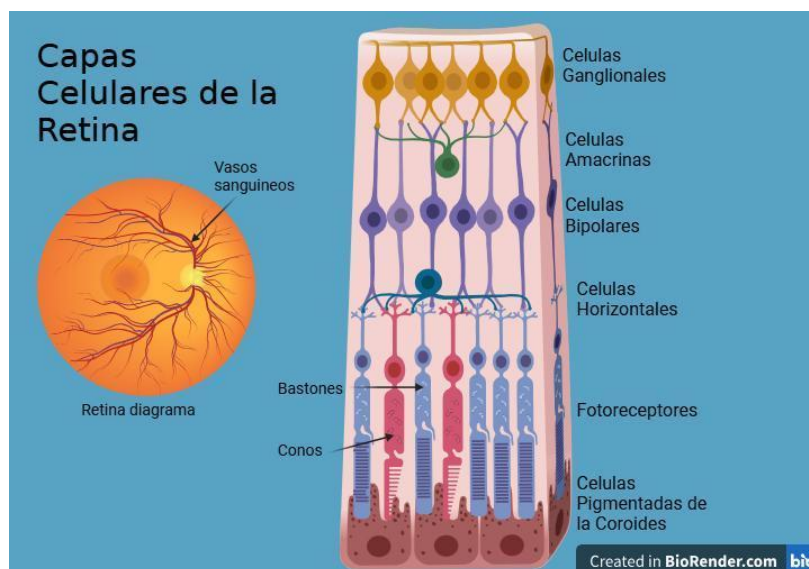


Figura 2. Componentes celulares de la retina (Biorender Brandon Ortiz Pérez, 2024).

En la retina de los humanos el 95% son células fotorreceptoras de bastones (aprox. 100 millones), se especializan en el registro de niveles de poca luz, ayudando así a crear una visión en blanco y negro, conocida como visión escotópica. Los bastones se ubican en la retina externa y va aumentando el número en medida que se acercan a la periferia de la retina, difieren de los conos de varias maneras. Los bastones tienen baja velocidad de respuesta, baja agudeza espacial y baja sensibilidad al contraste, en cambio, los conos tienen alta sensibilidad de contraste y agudeza espacial rápida. Los bastones, tienen una mayor sensibilidad a los fotones esto debido a la proteína llamada rodopsina que es un pigmento sensible a la luz (Kawamura & Tachibanaki, 2008).

La retina humana contiene alrededor de 6 a 7 millones de conos en total, que representan el 5 % total de fotorreceptores retinianos, pero la agudeza visual depende de tan solo 100000 conos. A diferencia de los bastones, los conos son menos sensibles a los fotones en general, pero responden mejor a una de las tres longitudes de onda específicas (colores) de la luz. Las

células cónicas se especializan en detectar luz roja (64%), luz verde (32 %) o luz azul (2%) y se concentran principalmente en el área central de la retina conocida como mácula, que también contiene fovea (Tabla1) (Mahabadi & Al Khalili, 2024).

Tabla 1. Comparación entre conos y bastones (Lamb, 2016).

	Conos y visión fotópica	Bastones y visión escotópica
Contribución	Proporcionan casi toda la visión	Funcionan en condiciones restringidas
Agudeza espacial	Extremadamente alto	Muy bajo
Velocidad de respuesta	Muy rápido	Lento
Rango de funcionamiento	Grande	Restringido
Impregnación	No se saturan con luz constante, sin importar la brillantez	Se saturan en niveles crepusculares y no responden en niveles de iluminación diurnos
Sensibilidad al contraste	Alta	Baja
Adaptación oscura del sistema visual	Recupera la sensibilidad total en 5 minutos	Recupera la visión completa en 40 minutos
Visión del color	Tricromática	Monocromática
Proporción de fotorreceptores en la retina	5%	95%
Proporción de fotorreceptoras en la fovea	100%	0%

Las mutaciones puntuales son cambios en un solo nucleótido (A, T, C, G) en la secuencia de ADN. Estas mutaciones pueden tener efectos significativos en la función de los genes, dependiendo de su ubicación y tipo. A continuación, se indican las principales mutaciones puntuales (Stenson et al., 2017; Veltman & Brunner, 2012).

1. Sustituciones (Cambios de base)

Ocurren cuando un nucleótido es reemplazado por otro. Dependiendo del efecto sobre la secuencia de aminoácidos, se clasifican en: Mutaciones sinónimas (silenciosas): Cambian un nucleótido, pero no alteran el aminoácido codificado debido a la redundancia del código genético. Ejemplo: Cambiar de CUU (Leucina) a CUC (Leucina).

1. Inserciones

Se añade uno o más nucleótidos en la secuencia de ADN. Pueden causar un cambio en el marco de lectura (frameshift) si no se insertan en múltiplos de tres nucleótidos, lo que altera toda la secuencia de aminoácidos a partir del punto de inserción. Ejemplo: Insertar una A en la secuencia ATG → AATG.

2. Deleciones

Se elimina uno o más nucleótidos de la secuencia de ADN. Al igual que las inserciones, pueden causar un cambio en el marco de lectura si no se eliminan en múltiplos de tres nucleótidos. Ejemplo: Eliminar una T en la secuencia ATG → AG.

3. Mutaciones en sitios de empalme (Splicing)

Ocurren en las regiones de unión del intrón-exón y afectan el proceso de empalme del ARN mensajero (ARNm). Pueden provocar la eliminación de exones o la inclusión de intrones en el ARNm maduro, lo que resulta en una proteína anormal. Ejemplo: Mutación en el sitio donador (5') o aceptor (3') de empalme (Baralle, 2005)

4. Mutaciones de sentido erróneo (Missense)

Cambian un nucleótido, lo que resulta en la codificación de un aminoácido diferente se enfoca en cambios que alteran significativamente la función de la proteína. Pueden causar enfermedades genéticas si afectan regiones críticas de la proteína. Ejemplo: Cambiar de GAG (Ácido glutámico) a GUG (Valina) en la hemoglobina, causando anemia falciforme (Richards et al., 2015).

Los defectos genéticos o alteraciones causadas por el ambiente son una de las principales causas para la pérdida de visión grave y las enfermedades heredadas de la retina (IRD), afectando a 1 de cada 2000-4000 individuos resultando de más de 2 millones de personas afectadas en el mundo (Ascari, 2020).

Las IRD son un grupo de enfermedades raras que a menudo conducen a una pérdida permanente de la visión, afectan principalmente a los fotorreceptores de la retina y a las células epiteliales pigmentarias conduciendo a la neurodegeneración y finalmente a la apoptosis (Kawamura & Tachibanaki, 2012). Se han reportado más de 260 genes (RetNet) relacionados con estas enfermedades (Coppieters et al., 2016; Nuzbrokh et al., 2021). El grupo con IRD más grande dentro de estas distrofias son las retinopatías pigmentarias, patología relacionada con un insuficiente desarrollo o pérdida de los fotorreceptores de la retina, donde la forma más común es la retinitis pigmentosa (RP) no sindrómica (Griffith et al., 2022).

Los trastornos autosómicos recesivos se caracterizan por la pérdida de función de genes que codifican ciertas proteínas. En las enfermedades autosómicas dominante, como la RP asociada a rodopsina (RHO), el fenotipo suele ser el resultado de mutaciones de ganancia de función, donde una copia del gen expresa una proteína que funciona normalmente y la otra copia del gen expresa una proteína perjudicial que necesita ser suprimida (Talib & Boon, 2020).

Las IRD, tienen un impacto importante en la calidad de vida de los pacientes, asimismo, hay un gran número de centros de investigaciones (3billion, gnomAD, ClinVar, HGVS, HGMD entre otros), que están investigando a nivel genético y epigenético, donde, han reportado genes implicados en estas distrofias de retina de cono y bastón y uno de ellos, es el gen RCBTB1, una proteína presente en los tejidos humanos (Coppieters et al., 2016), participa en el intercambio de nucleótidos de guanina similar a un regulador de condensación cromosómica, está relacionado con la regulación del ciclo celular mediante la remodelación de la cromatina, de igual forma, puede funcionar como un supresor de tumores regulando las vías de daño/reparación del ADN y la apoptosis. Se ha observado que RCBTB1 puede ser un adaptador de sustrato para un complejo de ligasa E3 cullin3 (CUL3) que media en la ubiquitinación para la degradación proteasomal de las proteínas diana (Figura 3). En cuanto

a estructura, posee dominios BTB (Broad-Complex, Tramtrack y Bric a Brac) / POZ (poxvirus y dedo de zinc) y dominios RCC1 (regulador de la condensación) cuenta con 531 nucleótidos ubicado en el cromosoma 13q14 (Huang et al., 2019). Las mutaciones bialélicas en RCBTB1 se han asociado con distintas enfermedades hereditarias de la retina como enfermedad de Coats y vitreorretinopatía exudativa familiar (FEVR) (Huang et al., 2019), también pueden causar distrofia retiniana aislada y sindrómica (Figura 3) (Stogios et al., 2005; Chaharbakhshi & Jemc, 2016).

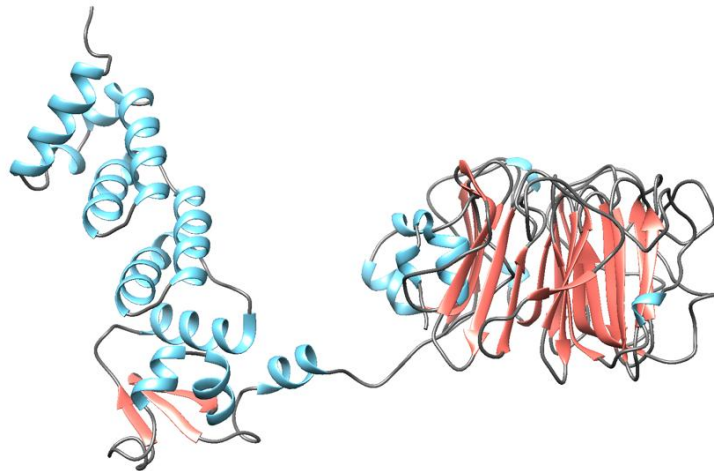


Figura 3. Modelado de RCBTB1 en Chimera. RCC está constituido por 7 repeticiones de lámina que forman una **hélice beta**. BTB se constituye principalmente por **alfa hélices** (Ascari, 2020).

Antecedentes

El gen RCBTB1 tiene una expresión ubicua en los tejidos de humanos adultos, aunque se ha revelado una expresión mayor de RNAm en la retina neural humana a comparación con el epitelio pigmentario de la retina (Catomeris et al., 2022a)

Distintos trabajos hechos a diferentes pacientes han proporcionado información valiosa sobre el fenotipo y las características clínicas de las mutaciones del gen RCBTB1, como el caso de una mujer y su hermano de origen Chino (Huang et al., 2021) los cuales poseen las mutaciones puntuales (c.170delG y c.707delA) heterocigotas del gen RCBTB1, en el cual se realizó su caracterización clínica por medio de diferentes exámenes y pruebas oftalmológicas, adicional a esto también se realizó un análisis genéticos del gen RCBTB1, teniendo como resultado la presencia de una distrofia visual en los pacientes y una disminución en la expresión del ARNm del gen RCBTB1, esto demuestra que la tasa de expansión de la atrofia visual y el cambio de volumen macular son válidos para monitorear la retinopatía ocular asociada a RCBTB1.

Se realizaron estudios de identificación de mutaciones del gen RCBTB1 y su relación con las distrofias de retina, en tres pacientes no relacionados con una etnia francocanadiense presentan las mutaciones p. Ser342Leu en los tres casos, y la presencia de una variante única Gln120* y Pro224Leu en dos de los pacientes, en todos los pacientes presentaban una enfermedad predominantemente macular en los ojos (Catomeris et al., 2022a).

También, se realizaron un mapeo genético completo y una secuenciación del exoma a una familia consanguínea (Coppieters et al., 2016) revelando así la presencia de diferentes mutaciones como c.973C>T (p.His325Tyr) de RCBTB1, en los pacientes afectados presentaban retinosis pigmentaria (RP), insuficiencia ovárica primaria y discapacidad intelectual leve (Coppieters et al., 2016)

En otro estudio realizado en tres pacientes taiwaneses (Wu et al., 2016) se identificaron dos mutaciones heterocigotas del genRCBTB1 a través de una secuenciación del exoma provocando un declive en los niveles de mRNA del mismo gen, se identificó que en los pacientes afectados presentaban una disminución en los niveles de RNAm de RCBTB1, también se demostró que RCBTB1 participa en la vía de señalización Norrin este es un mecanismo crucial en el desarrollo vascular y el mantenimiento de la barrera hemano-retina. Mediada por la proteína Norrin que actúa como ligando para el receptor FZD4 y activa la vía

de señalización Wnt/ β -catenina, esta vía es crucial para el desarrollo embrionario, la proliferación celular, la diferenciación y la homeóstasis tisular, esta al ser inhibido provoca una reducción en la acumulación nuclear de β -catenina, estos resultados demuestran que la expresión reducida de RCBTB1 puede conducir a defectos en la angiogénesis y que este gen podría estar involucrado de manera genética con las vitreorretinopatías (Wu et al., 2016; Ye et al., 2010).

Los defectos que pueden presentarse el gen RCBTB1, también pueden afectar a organelos celulares (Huang et al., 2023), un paciente que presentaba mutaciones de RCBTB1 mostraron en sus células epiteliales pigmentarias de la retina (EPR) una ultra estructuración mitocondrial anormal, sumando a esto las células de EPR también presentaban un aumento en las especies reactivas de oxígeno (ROS), estos hallazgos demuestran que la deficiencia de RCBTB1 en las células epiteliales pigmentarias está asociada con daño mitocondrial (Huang et al., 2023).

Esta deficiencia en los niveles de RNA en el gen RCBTB1 en las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) de un paciente con presencia de retinopatía puede llegar a restaurarse con el uso de vectores virales, en un paciente que presentaba células madre pluripotentes con mutaciones heterocigotas compuestas de RCBTB1 (c.170delG y c.707delA) se le administró vectores AAV (vectores de virus adeno-asociados) que portaban un transgén RCBTB1 de una paciente sano, este tratamiento corrigió los déficits en la expresión génica y la ultraestructura del epitelio pigmentario de la retina, lo que respalda el uso de la terapia de reemplazo génico (Figura 4) (Huang et al., 2021)

Sumado a esto último se han realizado trabajos en la generación de líneas celulares de células madre pluripotentes inducidas, generados de una paciente de 45 años de origen asiático que presentaba distrofia de retina con mutaciones heterocigotas compuestas en RCBTB1 (c.170delG y c.707delA), estas líneas celulares de células madre se usaron para la reprogramación de fibroblastos, pero este hallazgo nos da un modelo útil para futuras investigación con células madre y poder identificar mejor las fisiopatológico de las mutaciones en el gen RCBTB1 (Huang et al., 2019).

Las mutaciones puntuales en el gen RCBTB1 (RCC1 and BTB Domain Containing Protein) están asociadas principalmente con enfermedades hereditarias de la retina, como la **retinitis**

pigmentosa autosómica dominante. A continuación, se describen algunas mutaciones puntuales documentadas en la literatura científica: c. 1025 C>T **p.(Ser342Leu)**.

La mutación c.1025 C>T **p.(Ser342Leu)** en el gen RCBTB1 está asociada con distrofia de retina, particularmente con la retinitis pigmentosa y distrofia macular. Esta mutación provoca un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína RCBTB1, sustituyendo la serina (Ser) por leucina (Leu) en la posición 342, lo que puede alterar la estructura y función de la proteína, afectando la integridad de los fotorreceptores en la retina (Dryja et al., 1990; Hendee et al., 2018).

Tipo: Mutación missense (cambio de un nucleótido que altera un aminoácido): **c.400-2A>G**. La mutación c.400-2A>G está asociada con las distrofias de retina, específicamente en el contexto de mutaciones en el gen PRPH2 (también conocido como RDS, por Retinal Degeneration Slow). Este gen codifica una proteína esencial para la estructura y función de los fotorreceptores en la retina. La mutación c.400-2A>G afecta el sitio de empalme (splicing) del ARN mensajero, lo que puede alterar la producción de la proteína PRPH2 y conducir a enfermedades retinianas como la retinitis pigmentosa o la distrofia macular (Peeters et al., 2021).

- **c.337G>A (p.Gly113Ser)**

La mutación c.337G>A (p.Gly113Ser) en el gen RCBTB1 está asociada con distrofias de retina, particularmente con la retinitis pigmentosa y la distrofia macular. Esta mutación provoca un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína PRPH2, sustituyendo la glicina (Gly) por serina (Ser) en la posición 113, lo que puede alterar la estructura y función de la proteína, afectando la integridad de los fotorreceptores en la retina (Dryja et al., 1995; Sullivan et al., 2006).

- **c. 671 C>T p.(Pro224Leu)**

La mutación p.Pro244Leu en el gen RCBTB1 ha sido identificada como una de las mutaciones asociadas con retinitis pigmentosa (RP), una forma de distrofia retiniana que conduce a la degeneración de los fotorreceptores y a la pérdida progresiva de la visión. Esta mutación específica resulta en la sustitución de un residuo de prolina (Pro) por leucina (Leu)

en la posición 244 de la proteína RCBTB1, lo que podría afectar su función y contribuir a la patogénesis de la enfermedad (Boon et al., 2008; Catomeris et al., 2022b).

- **c.1049G>A (p.Arg350Gln)***

La mutación c.1049G>A (p.Arg350Gln) en el gen está asociada con distrofias de retina, particularmente con la retinitis pigmentosa y la distrofia macular. Esta mutación provoca un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína PRPH2, sustituyendo la arginina (Arg) por glutamina (Gln) en la posición 350, lo que puede alterar la estructura y función de la proteína, afectando la integridad de los fotorreceptores en la retina provocando una alteración en el dominio RCC1, afectando la unión a cromatina y la función en la vía de ubiquitinación.

- *Asociación clínica*: Reportada en casos esporádicos de degeneración retiniana (Dryja et al., 1995).

No todas las mutaciones descritas en el gen RCBTB1 asociadas a distrofias de retina son puntuales. Sin embargo, las mutaciones puntuales (SNVs, single nucleotide variants) son las más reportadas en la literatura científica para este gen en el contexto de enfermedades retinianas hereditarias.

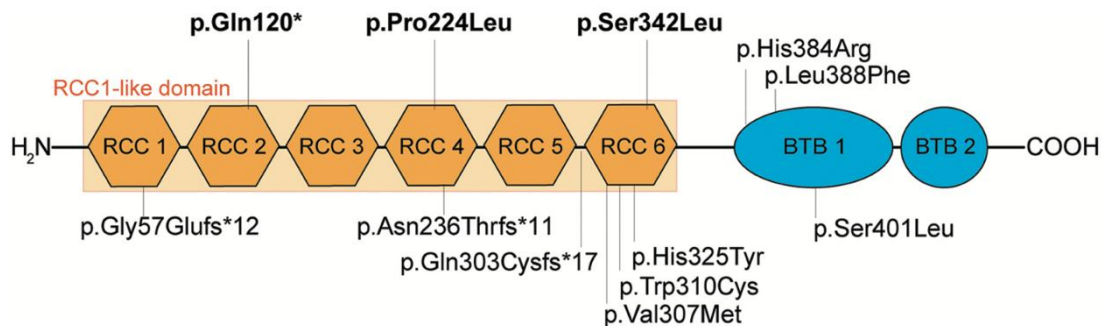


Figura 4. Ubicación de las mutaciones del gen RCBTB1 divididas en los dominios del gen, asociadas a retinopatías (Catomeris et al., 2022a).

Justificación

Los problemas de visión cada día afectan a más personas, principalmente en la edad adulta y la vejez, siendo esto un problema para los países de primer mundo y en desarrollo. Las enfermedades retinianas hereditarias, como las distrofias de retina, representan un desafío no solo médico, sino también económico para los sistemas de salud y las familias afectadas. En México, donde los recursos destinados a la salud son limitados y la atención especializada en oftalmología genética es escasa, el diagnóstico temprano y preciso de estas enfermedades puede tener un impacto significativo en la reducción de costos asociados con tratamientos prolongados, intervenciones quirúrgicas y la pérdida de productividad debido a la discapacidad visual. Las distrofias de retina son mutaciones que ocurren en el gen o genes de una persona, estas mutaciones alteran el funcionamiento adecuado del ojo lo que provoca una disminución en la calidad de la vista; estas mutaciones tienen alta probabilidad que las presenten sus progenitores.

El gen RCBTB1 se ha relacionado con distrofias de retina en diversas investigaciones en diferentes partes del mundo, al presentar RCBTB1 mutaciones que condicionan la visión de los pacientes. En México no se han realizado estudios acerca de este gen y los efectos que podría tener en la sociedad mexicana.

La obtención de muestras no invasivas es esencial en pacientes pediátricos y con discapacidad visual debido a su sensibilidad física y emocional, los riesgos asociados a métodos invasivos y la necesidad de un diagnóstico temprano y preciso en enfermedades retinianas hereditarias. En el contexto de México, donde los recursos son limitados y la atención especializada es escasa, los métodos no invasivos no solo mejoran la experiencia del paciente, sino que también contribuyen a reducir costos y fomentar la investigación en genética oftalmológica. Esto es especialmente relevante en el estudio de genes como el RCBTB1, cuyas mutaciones están relacionadas con distrofias de retina y cuyo impacto en la población mexicana aún no ha sido explorado.

Planteamiento del problema

Mutaciones en el gen RCBTB1, son causante de diversas enfermedades que abordan las distrofias en la retina y que ocasionan problemas severos en la visión. Hasta el momento, en México no se han reportado genes específicos para que se presente la disfunción visual, por lo cual, la presente investigación, propone que el gen RCBTB1, podría participar en este proceso de perdida visual (Catomeris et al., 2022a; Huang et al., 2019, 2021, 2023; Kondo, 2015; McLenachan et al., 2022; Wu et al., 2016; Yang, Sun, et al., 2021; Yang, Xiao, et al., 2021).

Hipótesis

La alta tasa de personas con algún tipo de problema del sistema visual como baja visión o ceguera en la población mexicana, se debe a la presencia de mutaciones en genes del sistema visual, uno de los posibles genes es el gen RCBTB1, que participa en la disfunción de los fotorreceptores de la retina, para su caracterización se estandarizo un metodología para su obtención a partir de muestras de saliva.

Objetivos

Objetivos generales

Estandarizar un método de extracción de gADN a partir de muestras de pacientes sanos.

Objetivos específicos

- Aislar gADN total de muestras de sangre periférica.
- Aislar gADN a partir del paquete blanco de sangre periférica.
- Aislar gADN de una muestra de saliva.
- Estandarizar una metodología estandarizada para la identificación de mutaciones en el gen RCBTB1.
- Evaluar la viabilidad de diferentes métodos de extracción de ADN (sanguíneo y salival) para la detección de mutaciones en el gen RCBTB1.
- Optimizar las condiciones de la PCR para garantizar una amplificación eficiente y específica del gen RCBTB1.
- Comparar la eficiencia de extracción de ADN genómico total de muestras sanguíneas y mucosa.
- Establecer un protocolo estandarizado para la extracción de ADN genómico a partir de muestras de sangre y saliva.

Material y métodos

Material

Para la realización de la extracción de muestras sanguíneas y bucales se utilizó como material, tubos de muestras de 10ml y tubos Eppendorf de 3ml (nuevo y estéril). Para el proceso de punción de la piel y extracción y recolección sanguínea por medio de tubos vacutainer. Para la extracción de muestras bucales se utilizaron cepillos odontológicos estériles y agua salina, esto para retirar de la forma más sencilla las células epiteliales bucales y almacenarlas en tubos eppendorf. Adicionalmente, a todo esto, también se utilizó una centrifugadora para precipitar las células a analizar.

En el proceso de obtención de ADN genómico se utilizó las células que previamente se obtuvieron de la extracción de muestras bucales y sanguíneas, se utilizó el kit de extracción de ADN, Quick-ADN Microprep, este kit ya contaba con todo lo necesario para realizar el rompimiento celular, su limpieza de impurezas y la recolección de ADN genómico. De igual manera adicionalmente a esto se utilizó una centrifugadora y un vortex para realizar la precipitación del ADN.

En el procedimiento de la PCR se realizó con el gADN extraído anteriormente de las muestras de los individuos, para esta técnica se utilizaron los primers diseñados previamente y se adicionaron con una mezcla master Mix, todos estos ingredientes se colocaron en un termociclador para realizar este procedimiento en las condiciones correspondientes y obtener una explicación adecuada del gen a analizar.

Metodología

a) Consulta bibliográfica.

Mediante el uso de buscadores científicos como Google académico, PudMed y Web of Science se realizó una recopilación bibliográfica por medio de palabras clave relacionadas con el tema de distrofias de retina enfocado a las mutaciones reportadas en RCBTB1.

b) Diseño de primers

Se uso la secuencia del gen completo de RCBTB1 de *Homo sapiens* (NM_018191.4) dentro de SnapGene (<https://www.snapgene.com>) dónde se seleccionaron las regiones de interés para el diseño de primers se tomó en cuenta los exones del gen y con eso las mutaciones a encontrar, esto debido al gran número de mutaciones documentadas y que podrían costar en su amplificación en la PCR y su revelación en la electroforesis , los cuales se construyeron utilizando la herramienta “Primer designing tool” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) de la plataforma NCBI utilizando los parámetros para el diseño de primers.

c) Datos de inclusión y exclusión de pacientes

Criterios de inclusión:

- Población objetivo: Individuos adultos mexicanos, con o sin diagnóstico previo de distrofia de retiniana.
- Ausencia de diagnóstico confirmado: Pacientes sin antecedentes clínicos de enfermedades retinianas (ejemplo: el caso del varón adulto analizado).
- Disposición a participar: Consentimiento informado firmado para la obtención de muestras biológicas (sangre o saliva).
- Accesibilidad a muestras: Disponibilidad de muestras de ADN de calidad suficiente para análisis genético (ejemplo: extracción exitosa mediante kits validados).

Criterios de exclusión:

- Enfermedades sistémicas: Pacientes con condiciones médicas no relacionadas que pudieran interferir con los resultados (ejemplo: diabetes avanzada, enfermedades autoinmunes).
- Contaminación de muestras: Muestras de ADN con baja pureza, degradadas o contaminadas (ejemplo: fallas en la electroforesis o PCR).
- Antecedentes de trauma ocular: Individuos con historial de lesiones o cirugías oculares que pudieran confundir los hallazgos genéticos.

- Falta de consentimiento: Pacientes que no firmaron el protocolo de consentimiento informado o se retiraron del estudio

Este estudio se realizó de acuerdo con los principios éticos establecidos en la **Declaración de Helsinki** para la investigación médica en seres humanos. Todos los participantes fueron informados detalladamente sobre los objetivos, procedimientos, riesgos y beneficios del estudio, y se les solicitó su consentimiento informado por escrito antes de su participación. Se garantizó la confidencialidad de los datos personales y médicos de los participantes, y se aseguró que su participación fuera voluntaria, pudiendo retirarse del estudio en cualquier momento sin consecuencia alguna (“World Medical Association Declaration of Helsinki,” 2013).

d) Toma de muestra

A los pacientes se les informo de toda la investigación a realizar, también se les pidió firmar la carta de consentimiento, para poder proceder a la toma de muestra.

a. Extracción de sangre

La sangre se extrajo mediante el sistema de vacutainer, recolectando la sangre en tubos con EDTA.

- I. Se tomaron 100 μ L de sangre en un tubo eppendorf.
- II. Se tomaron 200 μ L de sangre en un tubo eppendorf.
- III. La sangre se dejó reposar 24 horas para separar el plasma, se recolectó el plasma, se centrifugó a 5000 rpm por 5 min.



Figura 5. Fotografía de toma de muestra sanguínea utilizando el sistema Vacutainer.

b. Extracción de células bucales

Con un cepillo estéril se frotó dentro de las mejillas unas 15 veces de cada lado, este se lavó en 100 μ l de buffer PBS 1x, se centrifugó a 7,000 rpm x 5 minutos, se desechó conservó el pellet.



Figura 6. Fotografía de raspado de mejillas para la extracción de células bucales.

e) Extracción de gADN

Se adicionaron 400 μL de Genomic Lysis buffer (800 μL al tubo con 200 μL de sangre), se mezclaron 6 seg. en vortex y se dejó interaccionar 10 min., transcurrido el tiempo, la solución se traspasó a una columna Zymo spin con un tubo de colección y se centrifugó a 10,000 g por 1 min. La columna se colocó en un nuevo tubo de colección, se agregaron 200 μl de buffer ADN pre-wash a la columna, se centrifugó a 10,000 g por 1 min. Se desechó el filtrado, se adicionaron 500 μL de buffer gADN Wash y se centrifugó a 10,000 g por 1 min. Finalmente, la columna se traspasó a un tubo eppendorf dónde se le adicionó 50 μL de solución de elución y se dejó reposar por 5 min. y se centrifugó a 10,000 g por 1 min.

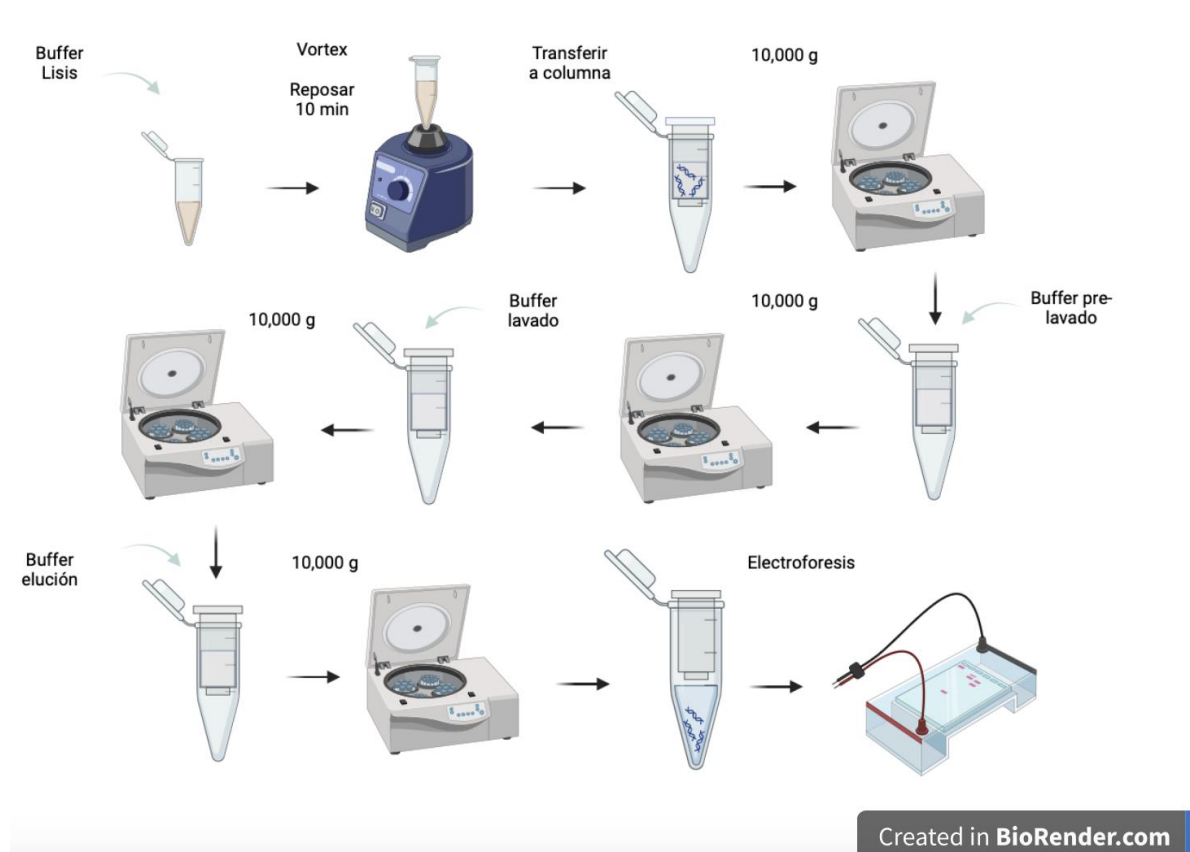


Figura 6. Metodología para la extracción de ADN genómico (Creado en Biorender, Brandon Ortiz Pérez y Claudia Mancilla Simbro, 2024).

f) Identificación de ADN genómico por medio de electroforesis

Se preparó un gel de agarosa al 1% con buffer TAE_x50 (Tris, Ácido acético y EDTA), el mismo buffer se empleó para el llenado de la cámara. Se colocaron 3 µL de marcador de peso molecular de ADN de 250pb a 10,000pb, las muestras de ADN se cargaron con 2 µL de buffer de carga y 7 µL de ADN genómico extraído. El gel se corrió a 60 volts por 10 minutos y a 90 volts por 1 hora. Para el revelado, el gel se sumergió 10 min a una solución con bromuro de etidio, se tomó la imagen en el transiluminador UV_UVP PhotoDoc.

g) Purificación del ADN por precipitación con acetato de sodio e isopropanol.

Se agregó 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M al ADN y se adicionó 1 µL de glucógeno grado biología molecular. Se agregó 1 volumen de isopropanol y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces y dejar precipitar en hielo por 15 minutos. Se centrifugó a 14000 rpm por 20 min. a 4°C. Se decantó el sobrenadante, en ADN se lavó con 400 µL de etanol al 70%, se mezcló por inmersión por 30 segundos y se centrifugó a 14000 rpm por 8 min. a 4°C. Se decanta el etanol, se vuelve a centrifugar a 12000 rpm durante 5 min. a 4°C y se quita el resto de etanol con una micropipeta, se colocó en el termoblock a 38°C durante 10 min. para evaporar los restos de etanol, se resuspendió en 15 µL de agua milli-Q (Tabla 2).

h) Amplificación con los primers Rcbtb1E3-E4 y Rcbtb1E9

Para la amplificación de PCR (µl por cada tubo):

Tabla 2. Volúmenes de los componentes para realizar la PCR con los primers Rcbtb1E3-E4.

Componente	Volumen (µL)
Master mix	5
Primer Rcbtb1E3-E4F	0.5
Primer Rcbtb1E3-E4R	0.5
gADN	2
Agua PCR	2
Total:	10

Dejando un control negativo (Tabla3).

Tabla 3. Condiciones de la PCR para los primers Rcbtb1E3-E4.

Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (seg.)
Desnaturalización inicial	1	95	300
Desnaturalización	30	95	30
Alineamiento	30	53	30
Extensión	30	72	50
Extensión final	1	72	300

Resultados

El análisis bibliométrico de las investigaciones que versaron en la identificación y análisis de mutaciones del gen RCBTB1, se recopilaron todas las mutaciones encontradas (Tabla 1, 2 y 3), que se presentaban en personas con algún tipo de problema de visión en diferentes regiones del mundo, dónde la república de China ha reportado la mayor cantidad de mutaciones. Se observó que las mutaciones encontradas son heterogéneas, mostrando mutaciones *missense*, deleciones e inserciones, siendo estas últimas relevantes debido a que modifican toda la secuencia posterior a la región dónde ocurre, cambiando completamente la secuencia y/o codificando un codón de paro que detienen la traducción (Tabla 4).

Tabla 4. Mutaciones reportadas en la literatura de RCBTB1 asociadas a enfermedad.

Origen	Mutación	Ubicación E(Exon)	Característica	Referencia
Turquía	c.973C>T (p.His325Tyr)	E9	Distrofias de retinas hereditarias graves compatibles con retinitis pigmentosa	(Coppieters et al., 2016)
Italia	c.919G>A (p.Val307Met)	E9	Patrón progresivo como dismorfia reticular	
Grecia	c.919G>A (p.Val307Met)	E9	Atrofia coriorretiniana central y distrofia reticular periférica	
	c.930G>T (p.Trp310Cys)	E9		
Argelia	c.1151A>G (p.His384Arg)	E10	Patrón progresivo como dismorfia reticular	
	c.1202C>T (p.Ser401Leu)	E11	Pérdida de visión bilateral; Fondo de ojo con pigmentaciones irregulares bilaterales principalmente en la periferia media.	

E.E.U.U.	c.358 C>T p.(Gln120*) c. 1025 C>T p.(Ser342Leu)	E5 E9	Disminución de la visión central, deslumbramiento	(Catomeris et al., 2022a)
	c. 671 C>T p.(Pro224Leu) c. 1025 C>T p.(Ser342Leu)	E7 E9	Destellos, nictalopía	
	c. 1025 C>T p.(Ser342Leu)	E9	Disminución de la visión central, nictalopía	
China	c.152delinsTT p.Ser51Ilefs*2	E4	Distrofia cono-bastón	(Yang et al., 2021)
	c.170delG p.Gly57Glufs*12	E4	Retinitis pigmentosa, glaucoma, miopía	
	c.707delA p.Asn236Thrfs*11	E7	Retinitis pigmentosa, glaucoma, miopía, albinismo ocular	
	c.783_786delATAT p.Tyr262Glyfs*12	E8	Miopía	
	c.905_906insTT p.Gln303Cysfs*17	E9	Retinosis pigmentaria	
	c.1123 C > T p.Arg375*	E10	Catarata congénita	
	c.1262_1263delAT p.Tyr421Serfs*31	E11	Distrofias de retinas hereditarias	
	c.1428delC p.Ser477Leufs*11	E12	Glaucoma	
	c.-41-2A>C	I 2	Glaucoma, miopía, degeneración macular	
	c.126 + 2delT	I 3	Retinoblastoma	

	c.1172 + 1 G > C	I 10	Amaurosis congénita de Leber
China	c.170delG (p.Gly57Glufs*12) c.707delA (p.Asn236Thrfs*11)	E7	Nictalopía, destellos, retinopatía (Huang et al., 2021)
Taiwan	c. 707delA p.ASN236Thrfs*11	E7	Enfermedad de Coats (Wu et al., 2016)
	c.1172+1G>A p. Glu349Glyfs*17	E10	FEVR

Así mismo, se analizó en SnapGene, donde se identificaron las regiones dónde ocurrían las mutaciones (Tabla 3, mRNA del gen RCBTB1) (Figura 7y 8).

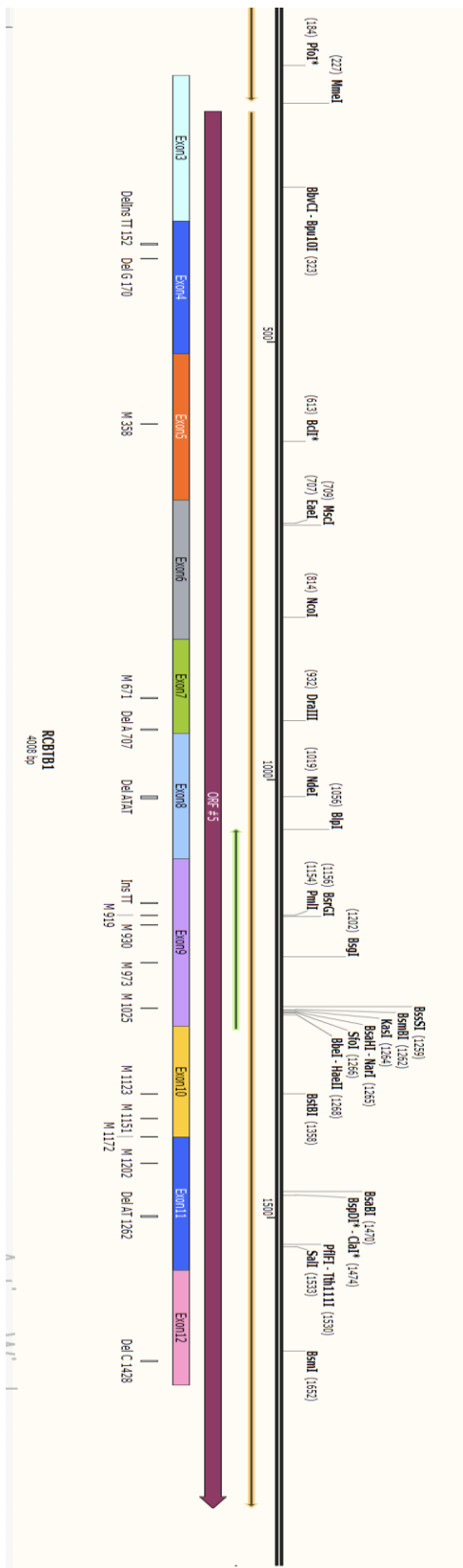


Figura 7. Ubicación de las distintas mutaciones encontradas en RCBTB1.

En la investigación fue relevante aislar el gADN, para identificar el gen y las mutaciones prevalentes en el gen RCBTB1, identificadas en la presente investigación (Figura 8).

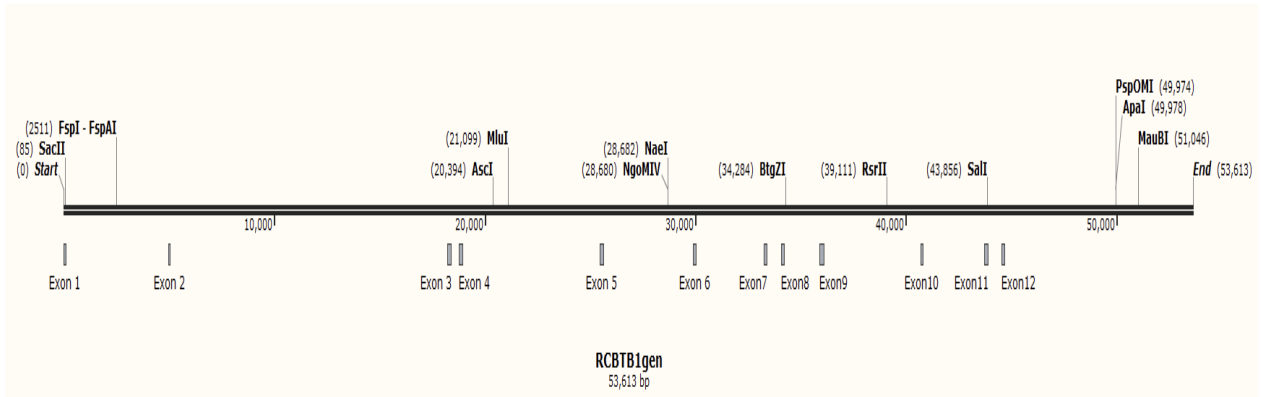


Figura 8. Gen completo de RCBTB1. Se identificaron las regiones de cada exón dentro del gen.

Lymphoprep

Con el gradiente celular Lymphoprep, se realizó una separación de los distintos tipos celulares presentes en las muestras sanguíneas, esto se realizó para obtener una separación de las células totales y conseguir así únicamente células mononucleares con el gADN.

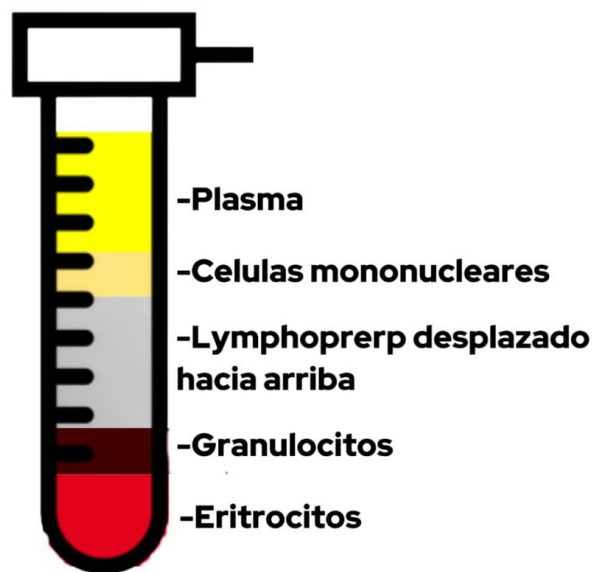


Figura 9. Fotografía de la separación de los distintos tipos celulares utilizando el gradiente celular Lymphoprep en donde se muestran las distintas capas; en color rojo el plasma, en la capa más delgada en color rojo claro se encuentran las células mononucleares, la zona más clara se encuentra el Lymphoprep y en la capa más profunda del tubo en color rojo oscuro se encuentran las células rojas de la sangre.

Observación de células monoculares en microscopio

Para la comprobación de la presencia de células mononucleares completas en el proceso de extracción de gADN. Se realizó una tinción con cristal violeta de la muestra de saliva (12 μ L de la muestra + 3 μ L de cristal violeta para teñir las células). Posteriormente, se observaron en un microscopio óptico, donde se observó que las células estaban en condiciones normales (Figura 12). Con ello, se corroboró la presencia de células mononucleares completas, posterior a ello, se procedió a la extracción del gADN.



Figura 10. Fotografía de un microscopio a 40x en donde se observan células mononucleares completas junto a una escala de medición.

Diseño de primers

En el programa snapgene se identificó la ubicación de cada exón dentro del gen, se seleccionaron 2 regiones dónde se reportan mutaciones de interés; se seleccionaron 2 pares, dónde los primers Rcbtb1E3-4 abarcan del exón 3 al exón 4, buscando 3 mutaciones; en los primers Rcbtb1E9 amplifican al exón 9, dónde se buscan 5 mutaciones (Tabla 5 y Figura 9).

Tabla 5. Primers diseñados para la amplificación de las 2 regiones de interés del gen RCBTB1 - gADN.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Tamaño de primer	Tm	GC%	Tamaño del producto
Rcbtb1E3-4 Forward	CTGGAATCCTTTCTGTTCCA GC	22	59.25	50	806
Rcbtb1E3-4 Reverse	ATAGCCCTATCTCCCCTAA GC	21	57.88	52.38	
Rcbtb1E9 Forward	TCTTGCCCTGATCTGTTGCT	20	59.31	50	452
Rcbtb1E9 Reverse	TCTGAGAGATCCCAAACC AGC	22	60.03	50	

Electroforesis para verificar el amplificado del gen RCBTB1

Se utilizaron dos métodos distintos para la obtención de muestras del paciente uno de origen sanguíneo y otro bucal, estos datos provienen de análisis sanguíneos de pacientes sanos. Estas electroforesis en gel de agarosa para identificar un segmento del gen RCBTB1.

El gADN, extraído de muestras sanguíneas se realizó una purificación de la muestra ADN total mediante precipitación con acetato de sodio e isopropanol para luego hacer la amplificación con los primers RCBTB1E3-E4, para posteriormente correrlas en gel de agarosa, utilizando 5µL del ADN ya amplificado más 2µL de buffer de carga y se colocó en

un pocillo del gel de agarosa, junto a 7 μ L del marcado de peso molecular en otro pocillo y se corrió dando como resultado la presencia de la banda de ADN en el gel.

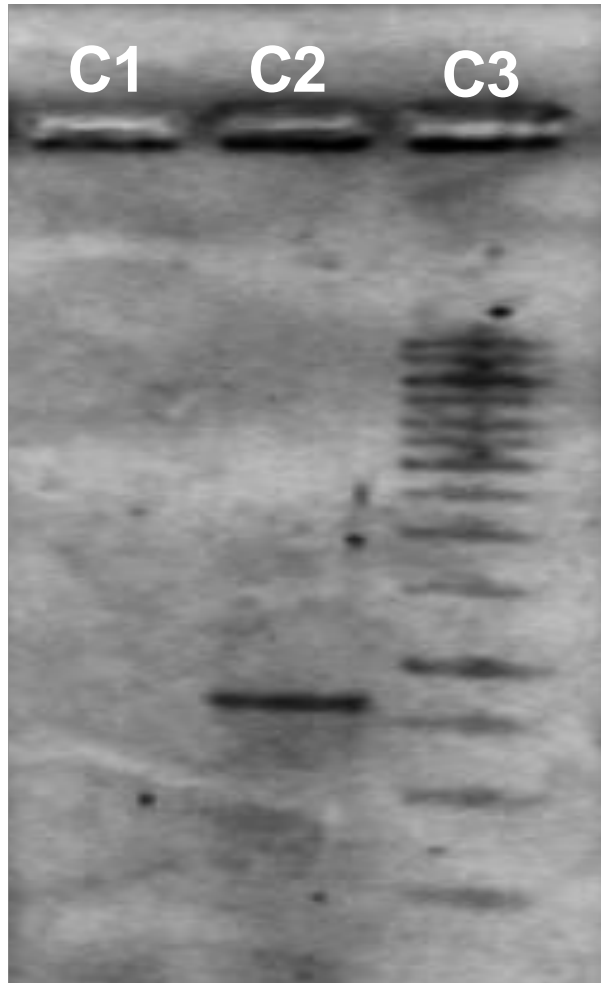


Figura 11. PCR con la muestra purificada utilizando el primer RCBTB1E3-E4. Carril 1(C1) – control negativo; Carril 2(C2) –PCR con las muestras de gADN genómico ya purificada; Carril 3(C3) – marcador de peso molecular.

Discusión

En este estudio desarrollamos un protocolo experimental que abarca desde la extracción de muestras de sangre y saliva para la obtención de gADN de alta pureza, hasta un análisis. Ello, permitió diseñar primers específicos (Rcbtb1E9 y Rcbtb1E3-4) para su uso en reacciones de PCR. Adicionalmente, de la muestra obtenida de pacientes sin diagnóstico de distrofia hereditaria de retina, se observa la presencia del segmento, por lo cual, se especula que está presente, ello, contribuye a proponer que está presente en pacientes sanos, para corroborar esta especulación, se tiene que secuenciar el gen completo, ello, contribuiría al entendimiento de la prevalencia y variabilidad genética de estas mutaciones.

Los resultados, muestran que el método sanguíneo fue el más eficiente para la extracción de gADN con fines de análisis genético. La utilización del primer Rcbtb1E3-4, diluido en una proporción 1:3 tras varios ajustes metodológicos, permitió la detección exitosa de bandas en geles de agarosa, confirmando la presencia de un segmento del gen RCBTB1. Sin embargo, en el caso específico de un paciente analizado, estas mutaciones no estuvieron asociadas con ninguna enfermedad ocular diagnosticada, incluyendo las distrofias hereditarias de retina. Esto sugiere que, aunque estas mutaciones están presentes en la población mexicana, no hay evidencia concluyente que las relacione directamente con patologías retinianas hereditarias. El presente estudio se alinea con investigaciones globales que destacan al gen RCBTB1 como un actor crítico en el desarrollo de distrofias retinianas hereditarias, pero también revela particularidades relevantes para la población mexicana. A continuación, se contextualizan los hallazgos en comparación con trabajos similares realizados en otras regiones.

Similitudes en las mutaciones identificadas

Las mutaciones detectadas en este trabajo, como p.Ser342Leu y p.Pro224Leu, coinciden con variantes reportadas en estudios previos por Caromeris et al., (Caromeris et al., 2022a) identificaron p.Ser342Leu en pacientes francocanadienses con distrofia macular, mientras que Huang et al., (Huang et al., 2021) describieron mutaciones por cambio de marco de lectura (c.170delG y c.707delA) en poblaciones asiáticas asociadas a retinopatías graves. Estas coincidencias sugieren que ciertas regiones del gen RCBTB1 (como los exones 4, 7 y 9) son "puntos de interés" mutacionales, posiblemente debido a su papel funcional en

dominios críticos como BTB y RCC1, esenciales para la ubiquitinación y la regulación del ciclo celular.

No obstante, a diferencia de estudios como el de Coppieters et al., (Coppieters et al., 2016), que vincularon mutaciones bialélicas en RCBTB1 (p.His325Tyr) con retinosis pigmentaria síndrómica en familias consanguíneas, en este trabajo no se observó una correlación fenotípica clara en los pacientes analizados. Esto podría reflejar diferencias en la penetrancia genética o la influencia de factores epigenéticos y ambientales no evaluados.

Metodologías comparadas: Extracción de gADN y diseño de primers

La elección de muestras sanguíneas como fuente principal de gADN, coincide con protocolos estandarizados en estudios como los de Wu et al., Yang et al., (Wu et al., 2016; Yang, Xiao, et al., 2021) quienes priorizaron sangre periférica para garantizar alta pureza y rendimiento. Sin embargo, este trabajo también exploró la saliva como alternativa menos invasiva, un enfoque innovador frente a investigaciones previas que raramente la utilizan para análisis de RCBTB1. Aunque, la eficiencia fue menor, este método podría optimizarse siguiendo modelos como los de Catomeris et al., (Catomeris et al., 2022a) quienes emplearon kits comerciales específicos para muestras salivales en poblaciones pediátricas.

Respecto al diseño de primers, Rcbtb1E3-E4 y Rcbtb1E9, se alinean con estrategias de amplificación dirigida a exones críticos, similares a las descritas por (Coppieters et al., 2016; Huang et al., 2019). No obstante, la necesidad de ajustar parámetros de PCR (T_m , volumen de ADN) para evitar inhibidores resalta un desafío técnico no ampliamente discutido en la literatura, sugiriendo que la estandarización requiere validación específica para cada población.

Un contraste notable con estudios previos es la falta de asociación entre las mutaciones identificadas y diagnósticos clínicos de distrofias retinianas en los pacientes mexicanos analizados. Esto difiere de trabajos como el de Wu et al., (Wu et al., 2016) donde mutaciones en RCBTB1 (p.Asn236Thrfs*11) se vincularon directamente con vitreoretinopatía exudativa familiar (FEVR), o de Huang et al., (Huang et al., 2021) que demostraron rescate fenotípico mediante terapia génica en modelos celulares.

Esta discrepancia podría explicarse por:

- Heterogeneidad alélica: Las mutaciones podrían ser variantes de significado incierto con efectos moderados, a diferencia de mutaciones truncantes reportadas en Asia.
- Factores modificadores: La presencia de genes compensatorios o haplotipos protectores en la población mexicana, no explorados en este estudio.
- Tamaño muestral reducido: A diferencia de cohortes multicéntricas (ej. Coppieters et al., 2016 con 12 familias), el análisis de pacientes (menos a 10) limita la estandarización.

Implicaciones para poblaciones latinoamericanas

Mientras estudios en Asia y Europa dominan la literatura sobre RCBTB1, este trabajo es pionero en explorar su rol en México. La detección de mutaciones previamente reportadas en otras etnias sugiere un origen evolutivo compartido, posiblemente por flujo génico histórico. Sin embargo, la identificación de variantes únicas en este estudio subraya la necesidad de expandir investigaciones en latinoamérica, donde la diversidad genética podría enmascarar o modular efectos patogénicos.

Conclusión

Este trabajo de investigación se centró en la estandarización de una técnica para la identificación de mutaciones en el gen RCBTB1, asociado con la degeneración de células de la retina y diversas distrofias retinianas hereditarias. A través de un enfoque metodológico que incluyó la extracción de gADN a partir de muestras sanguíneas y salivales, se logró diseñar y optimizar un protocolo de PCR para la amplificación de regiones específicas de un segmento del gen RCBTB1. Los resultados mostraron que la extracción de ADN a partir de sangre fue más eficiente, aunque la extracción de saliva se presenta como una alternativa menos invasiva y más cómoda para los pacientes.

Se identificaron varias mutaciones en el gen RCBTB1 en la población mexicana, aunque falta realizar una correlación directa entre estas mutaciones y la presencia de enfermedades retinianas hereditarias en los individuos analizados. Esto sugiere que, si bien las mutaciones en RCBTB1 están presentes en la población, su impacto fenotípico puede variar y no siempre conduce a patologías retinianas.

Este estudio subraya la importancia de continuar investigando la diversidad genética en poblaciones poco estudiadas, como la mexicana, para comprender mejor la prevalencia y el impacto de las mutaciones en genes asociados a enfermedades retinianas. Además, resalta la necesidad de ampliar el tamaño de la muestra y realizar estudios más exhaustivos que incluyan a pacientes diagnosticados con distrofias retinianas para establecer correlaciones genotipo-fenotipo más precisas.

En conclusión, este trabajo contribuye al conocimiento de las bases genéticas de las distrofias retinianas y sienta las bases para futuras investigaciones que podrían mejorar el diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades en la población mexicana y otras regiones de Latinoamérica.

Referencias

- Ascari, G. (2020). *CIL-EYE Functional characterization of potential ciliary genes involved in syndromic inherited retinal diseases*.
- Baralle, D. (2005). Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *Journal of Medical Genetics*, 42(10), 737–748. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.029538>
- Boon, C. J. F., den Hollander, A. I., Hoyng, C. B., Cremers, F. P. M., Klevering, B. J., & Keunen, J. E. E. (2008). The spectrum of retinal dystrophies caused by mutations in the peripherin/RDS gene. In *Progress in Retinal and Eye Research* (Vol. 27, Issue 2, pp. 213–235). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.01.002>
- Catomeris, A. J., Ballios, B. G., Sangermano, R., Wagner, N. E., Comander, J. I., Pierce, E. A., Place, E. M., Bujakowska, K. M., & Huckfeldt, R. M. (2022a). Novel RCBTB1 variants causing later-onset non-syndromic retinal dystrophy with macular chorioretinal atrophy. *Ophthalmic Genetics*, 43(3), 332–339. <https://doi.org/10.1080/13816810.2021.2023196>
- Catomeris, A. J., Ballios, B. G., Sangermano, R., Wagner, N. E., Comander, J. I., Pierce, E. A., Place, E. M., Bujakowska, K. M., & Huckfeldt, R. M. (2022b). Novel RCBTB1 variants causing later-onset non-syndromic retinal dystrophy with macular chorioretinal atrophy. *Ophthalmic Genetics*, 43(3), 332–339. <https://doi.org/10.1080/13816810.2021.2023196>
- Chaharbakhshi, E., & Jemc, J. C. (2016). Broad-complex, tramtrack, and bric-à-brac (BTB) proteins: Critical regulators of development. In *Genesis* (Vol. 54, Issue 10, pp. 505–518). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/dvg.22964>
- Coppieters, F., Ascari, G., Dannhausen, K., Nikopoulos, K., Peelman, F., Karlstetter, M., Xu, M., Brachet, C., Meunier, I., Tsilimbaris, M. K., Tsika, C., Blazaki, S. V., Vergult, S., Farinelli, P., Van Laethem, T., Bauwens, M., De Bruyne, M., Chen, R., Langmann, T., ... De Baere, E. (2016). Isolated and Syndromic Retinal Dystrophy Caused by Biallelic Mutations in RCBTB1, a Gene Implicated in Ubiquitination. *American Journal of Human Genetics*, 99(2), 470–480. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.06.017>
- Dryja, T. P., Finns, J. T., Peng4, Y.-W., Mcgee, T. L., Berson, E. L., Yaut, K.-W., & Baylor, D. (1995). Mutations in the gene encoding the a subunit of the rod cGMP-gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa. In *Genetics* (Vol. 92).
- Dryja, T. P., McGee, T. L., Reichel, E., Hahn, L. B., Cowley, G. S., Yandell, D. W., Sandberg, M. A., & Berson, E. L. (1990). A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature*, 343(6256), 364–366. <https://doi.org/10.1038/343364a0>
- Griffith, J., Sioufi, K., Wilbanks, L., Magrath, G. N., Say, E. A. T., Lyons, M. J., Wilkes, M., Pai, G. S., & Peterseim, M. M. W. (2022). Inherited Retinal Dystrophy in Southeastern United States: Characterization of South Carolina Patients and Comparative Literature Review. *Genes*, 13(8), 1490. <https://doi.org/10.3390/genes13081490>
- Grossniklaus, H. E., Geisert, E. E., & Nickerson, J. M. (2015). Introduction to the Retina. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 134, 383–396. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.06.001>
- Hendee, K. E., Sorokina, E. A., Muheisen, S. S., Reis, L. M., Tyler, R. C., Markovic, V., Cuturilo, G., Link, B. A., Semina, E. V., & Semina, E. (2018). *PITX2 deficiency and*

associated human disease: insights from the zebrafish model.

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddy074/4916087>

- Huang, Z., Zhang, D., Chen, S. C., Huang, D., Mackey, D., Chen, F. K., & McLaren, S. (2023). Mitochondrial Dysfunction and Impaired Antioxidant Responses in Retinal Pigment Epithelial Cells Derived from a Patient with RCBTB1-Associated Retinopathy. *Cells*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/cells12101358>
- Huang, Z., Zhang, D., Chen, S. C., Jennings, L., Carvalho, L. S., Fletcher, S., Chen, F. K., & McLaren, S. (2021). Gene replacement therapy restores RCBTB1 expression and cilium length in patient-derived retinal pigment epithelium. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(21), 10020–10027. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16911>
- Huang, Z., Zhang, D., Chen, S. C., Thompson, J. A., McLaren, T., Lamey, T., De Roach, J. N., McLaren, S., & Chen, F. K. (2019). Generation of three induced pluripotent stem cell lines from an isolated inherited retinal dystrophy patient with RCBTB1 frameshifting mutations. *Stem Cell Research*, 40. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101549>
- Kawamura, S., & Tachibanaki, S. (2008). Rod and cone photoreceptors: Molecular basis of the difference in their physiology. In *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* (Vol. 150, Issue 4, pp. 369–377). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.04.600>
- Kawamura, S., & Tachibanaki, S. (2012). Explaining the functional differences of rods versus cones. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, 1(5), 675–683. <https://doi.org/10.1002/wmts.8>
- Kondo, H. (2015). Complex genetics of familial exudative vitreoretinopathy and related pediatric retinal detachments. In *Taiwan Journal of Ophthalmology* (Vol. 5, Issue 2, pp. 56–62). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tjo.2015.04.002>
- Lamb, T. D. (2016). Why rods and cones? *Eye (Basingstoke)*, 30(2), 179–185. <https://doi.org/10.1038/eye.2015.236>
- Mahabadi, N., & Al Khalili, Y. (2024). *Neuroanatomy, Retina*.
- McLenachan, Sam, Chen, Fred, Mackey, David, Mellough, & Carla. (2022). Disease modelling and treatment development for RCBTB1-associated retinopathy. *Centre for Ophthalmology and Visual Science (Affiliated with the Lions Eye Institute)*.
- Nuzbrokh, Y., Ragi, S. D., & Tsang, S. H. (2021). Gene therapy for inherited retinal diseases. *Annals of Translational Medicine*, 9(15), 1278–1278. <https://doi.org/10.21037/atm-20-4726>
- Peeters, M. H. C. A., Khan, M., Rooijackers, A. A. M. B., Mulders, T., Haer-Wigman, L., Boon, C. J. F., Klaver, C. C. W., van den Born, L. I., Hoyng, C. B., Cremers, F. P. M., den Hollander, A. I., Dhaenens, C. M., & Collin, R. W. J. (2021). PRPH2 mutation update: In silico assessment of 245 reported and 7 novel variants in patients with retinal disease. *Human Mutation*, 42(12), 1521–1547. <https://doi.org/10.1002/humu.24275>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehms, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for

- Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–424.
<https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., Evans, K., Hayden, M., Heywood, S., Hussain, M., Phillips, A. D., & Cooper, D. N. (2017). The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Human Genetics*, 136(6), 665–677.
<https://doi.org/10.1007/s00439-017-1779-6>
- Stogios, P. J., Downs, G. S., Jauhal, J. J. S., Nandra, S. K., & Privé, G. G. (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biology*, 6(10).
<https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-10-r82>
- Sullivan, L. S., Bowne, S. J., Birch, D. G., Hughbanks-Wheaton, D., Heckenlively, J. R., Lewis, R. A., Garcia, C. A., Ruiz, R. S., Blanton, S. H., Northrup, H., Gire, A. I., Seaman, R., Duzkale, H., Spellacy, C. J., Zhu, J., Shankar, S. P., & Daiger, S. P. (2006). Prevalence of disease-causing mutations in families with autosomal dominant retinitis pigmentosa: A screen of known genes in 200 families. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47(7), 3052–3064. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1443>
- Talib, M., & Boon, C. J. F. (2020). Retinal dystrophies and the road to treatment: Clinical requirements and considerations. In *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology* (Vol. 9, Issue 3, pp. 159–179). Lippincott Williams and Wilkins.
<https://doi.org/10.1097/APO.0000000000000290>
- Tian, L., Kazmierkiewicz, K. L., Bowman, A. S., Li, M., Curcio, C. A., & Stambolian, D. E. (2015). Transcriptome of the human retina, retinal pigmented epithelium and choroid. *Genomics*, 105(5–6), 253–264. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.01.008>
- Veltman, J. A., & Brunner, H. G. (2012). De novo mutations in human genetic disease. *Nature Reviews Genetics*, 13(8), 565–575. <https://doi.org/10.1038/nrg3241>
- World Medical Association Declaration of Helsinki. (2013). *JAMA*, 310(20), 2191.
<https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
- Wu, J. H., Liu, J. H., Ko, Y. C., Wang, C. T. C. T., Chung, Y. C., Chu, K. C., Liu, T. T., Chao, H. M., Jiang, Y. J., Chen, S. J., & Chung, M. Y. (2016). Haploinsufficiency of RCBTB1 is associated with Coats disease and familial exudative vitreoretinopathy. *Human Molecular Genetics*, 25(8), 1637–1647. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw041>
- Yang, J., Sun, W., & Zhang, Q. (2021). Start and End with Genetics: RCBTB1 and Beyond. In *Current Eye Research* (Vol. 46, Issue 12, pp. 1932–1933). Taylor and Francis Ltd.
<https://doi.org/10.1080/02713683.2021.1933060>
- Yang, J., Xiao, X., Sun, W., Li, S., Jia, X., & Zhang, Q. (2021). Variants in RCBTB1 are Associated with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa but Not Autosomal Dominant FEVR. *Current Eye Research*, 46(6), 839–844.
<https://doi.org/10.1080/02713683.2020.1842457>
- Ye, X., Wang, Y., & Nathans, J. (2010). The Norrin/Frizzled4 signaling pathway in retinal vascular development and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 16(9), 417–425.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.07.003>