

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DETERMINACIÓN DE LAS MUTACIONES PRESENTES EN LOS GENES *MPZ*,
MED25, *GJB1*, *GDAP1*, DE LA DUPLICACIÓN DEL GEN *PMP22* Y
ESTABLECIMIENTO DE LA CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO EN
INDIVIDUOS COSTARRICENSES AFECTADOS CON LA ENFERMEDAD DE
CHARCOT-MARIE-TOOTH

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de
Postgrado en Biología para optar al grado y título de Maestría Académica en
Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular

SILVIA SÁNCHEZ CHACÓN

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2013

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque a él le debo todo lo que soy, todo lo que tengo y todo lo que me permite disfrutar.

A mis padres Rafael Sánchez y Carmen Chacón, a mis hermanos David, Carlos y Lauren por su apoyo cada día para que continúe luchando por mis metas.

A mi esposo Michael Rodríguez porque he contado con su paciencia, parecer y apoyo, en los buenos y malos momentos.

A mi tutor de la tesis, el Dr. Alejandro Leal, por su incondicional guía y por contribuir a mi crecimiento personal y profesional.

A los profesores Jorge Azofeifa, Gustavo Gutiérrez y Alejandro Sibaja, y a los médicos Alejandra Acosta y Alfonso Gutiérrez, por su colaboración en el desarrollo de mi tesis.

A todos los que me colaboraron tanto en el Instituto de Biomedicina como en el Hospital La Fe en España, durante la realización de los análisis de laboratorio.

Al CONICIT y la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por el financiamiento otorgado al proyecto “Determinación de la causa genética de neuropatías periféricas hereditarias (111-A4-334) inscrito al Programa de Investigación Neurociencias”

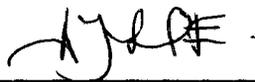
A la Asociación de Tamizaje Neonatal por su colaboración para la realización de mis estudios e investigación de la maestría.

A los pacientes por su ayuda y paciencia durante el transcurso del estudio.

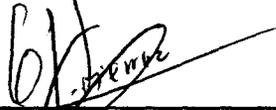
“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular.”



Dra. Henriette Raventós Vorst
**Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado**



Dr. Alejandro Leal Esquivel
Director de Tesis



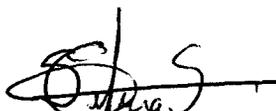
Dr. Gustavo Gutiérrez Espeleta
Asesor



Dr. Jorge Azofeifa Navas
Asesor



Dr. Ramiro Barrantes Mesén
**Representante del Director
Programa de Posgrado en Biología**



Silvia Lucía Sánchez Chacón
Candidata

ÍNDICE

Agradecimientos	ii
Hoja de Aprobación.....	viii
Resumen.....	vi
Lista de Cuadros	viii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Abreviaturas	xi
1. Antecedentes	1
1.1. Fisiología del Sistema Nervioso Periférico.....	2
1.2. Manifestaciones Clínicas	3
1.3. Diagnóstico de CMT.....	4
1.4. Tratamiento.....	5
1.5. Clasificación de la enfermedad CMT	7
1.6. Epidemiología Genética	8
2. Justificación.....	13
3. Objetivos	14
3.1. Objetivo General.....	14
3.2. Objetivos Específicos	14
4. Metodología	15
4.1. Participantes	15
4.2. Obtención de Muestras de sangre	18
4.3. Extracción y cuantificación del ADN.....	18
4.4. Análisis Molecular.....	18
4.5. Correlación Genotipo/ Fenotipo.....	27
4.6. Establecimiento de estrategia de diagnóstico	28
5. Resultados	29
5.1. Mutación en el gen <i>MED25</i>	29
5.2. Mutaciones en el gen <i>MPZ</i>	30
5.3. Mutación en el gen <i>GJB1</i>	33
5.4. Mutaciones en el gen <i>GDAP1</i>	35
5.5. Duplicación en el gen <i>PMP22</i>	37
5.6. Análisis Estadísticos.....	42

6. Discusión.....	48
6.1. Gen <i>MED25</i>	50
6.2. Gen <i>MPZ</i>	52
6.3. Gen <i>GJB1</i>	54
6.4. Gen <i>GDAP1</i>	55
6.5. Duplicación del gen <i>PMP22</i>	57
6.7. Correlación fenotipo- genotipo en los pacientes con CMT.....	64
7. Conclusiones.....	66
8. Bibliografía.....	68
9. Anexos.....	78
9.1. Anexo 1. Consentimiento Informado utilizado para el estudio de CMT....	78
9.2. Anexo 2. Hoja de Recolección de datos del Estudio de CMT.....	82
9.3. Anexo 3. Protocolo de Seguimiento para el Análisis de Mutaciones de CMT.....	86
9.4. Anexo 4. Variables fenotípicas evaluadas en los pacientes con diagnóstico molecular de CMT.....	94

RESUMEN

Charcot Marie Tooth (CMT), es la enfermedad hereditaria del sistema nervioso periférico más común, provocada por daños progresivos en el sistema nervioso periférico. Las mutaciones que disparan su desarrollo se localizan en genes expresados en células neuronales y de Schwann. Debido a la alta heterogeneidad genética se puede observar patrones de segregación mendeliana autosómicos dominantes, recesivos y ligados al cromosoma X.

Mutaciones en los genes *MED25*, *MPZ*, *GJB1*, *GDAP1* y la duplicación del gen *PMP22* fueron evaluadas en pacientes con CMT en Costa Rica, para determinar la importancia de cada mutación y correlacionar los síntomas con la mutación causante de CMT. Se analizaron 51 individuos diagnosticados con CMT por técnicas de secuenciación de ADN y MLPA, se llevó a cabo un análisis de correlación genotipo-fenotipo a través de Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) y análisis de Similitudes (ANOSIM), y a partir de estos análisis se diseñó una estrategia de búsqueda de genes responsables según dicha correlación.

Tomando en cuenta los estudios anteriores en nuestro país, se ha logrado hacer diagnóstico molecular de CMT en 20 familias, identificando 7 mutaciones en 5 genes evaluados. En esta investigación se logró realizar el diagnóstico molecular en 17 pacientes, en los cuales se determinó la presencia de la mutación Ala335Val (1004C>T) del gen *MED25* en uno de ellos, la cual fue hallada en un paciente perteneciente a la misma familia donde se encontró por primera vez; la mutación Tyr145Ser (434 A>C) del gen *MPZ* en 4 pacientes, la mutación Val13Met (37G>A) del gen *GJB1* se encontró en 6 pacientes, las mutaciones Gln163X/Ser194X (487C>T/581C>G) en el gen *GDAP1* en un individuo, y la duplicación del gen *PMP22* se encontró en 5 pacientes. Mutaciones en los genes *GDAP1* y *PMP22* no habían sido encontradas anteriormente en Costa Rica y al contrario de las frecuencias de otras poblaciones donde la duplicación del gen *PMP22* es la más frecuente, en nuestro país el gen *GJB1* es el responsable de más casos de CMT, seguido por *MPZ* y *PMP22*.

Además, se determinó que la sintomatología de los pacientes con la mutación en el gen *MPZ* tiende a diferir con la identificada en los genes *PMP22* y *GJB1*, mientras que en estos dos últimos genes se observa un traslape entre los síntomas. Así mismo, el fenotipo entre los pacientes con la mutación en *MPZ* presentan mayor variabilidad, y los pacientes con la duplicación en *PMP22* presentan una sintomatología más uniforme, seguido de los pacientes con la mutación en *GJB1*. A pesar del bajo porcentaje de significancia de las pruebas estadísticas, se puede sugerir que los resultados clínicos cualitativos y cuantitativos, se postulan como una herramienta útil para determinar las correlaciones entre el fenotipo y el genotipo de los pacientes con CMT.

Esta investigación es pionera en la búsqueda de mutaciones causantes de CMT en Costa Rica, con el fin de realizar un protocolo para diagnóstico molecular de la enfermedad procurando colaborar con el sistema de salud de nuestro país, debido a que el panel de mutaciones hallado en este estudio, la creación del protocolo de seguimiento y clave dicotómica generados en esta investigación, se pretende que sean utilizados para el diagnóstico de la enfermedad de CMT.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de los genes en estudio, según los diferentes tipos de CMT.....	8
Cuadro 2. Información de los pacientes (código, edad, sexo y procedencia) evaluados en esta investigación.....	16
Cuadro 3: Iniciadores utilizados para la amplificación del gen <i>MPZ</i>	20
Cuadro 4. Iniciadores utilizados para la amplificación del gen <i>GDAP1</i>	24
Cuadro 5. Mutaciones halladas en los pacientes con CMT y su correspondiente correlación con el resultado de la electromiografía y las características clínicas observadas. A.R: Autosómico Recesivo, A.D: Autosómico Dominante.....	38
Cuadro 6. Valores “p” del ANOSIM para cada comparación entre los síntomas de los pacientes de cada mutación.....	45
Cuadro 7. Valores de “R” del ANOSIM para cada comparación entre los síntomas de los pacientes de cada mutación. Los valores negativos de R se pueden interpretar como ausencia de diferencia.....	45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Componentes proteicos de una célula neuronal periférica y de las células de Schwann involucradas con la presencia de la enfermedad CMT.3
- Figura 2. Procedimiento para realizar el análisis de la duplicación del gen *PMP22* con la técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).....25
- Figura 3. Árbol genealógico que representa la familia del paciente con el código 1027 (II:II).....29
- Figura 4. Secuenciación del exón 9 del gen *MED25* del paciente con el código 1027, donde se observa el cambio homocigoto 1004 C >T.....29
- Figura 5. Árbol genealógico que representa la familia del paciente con el código 1012 (III:IV).....31
- Figura 6. Secuenciación del exón 3 del gen *MPZ* del paciente con el código 1012, donde se observa el cambio heterocigoto 434 A>C.....31
- Figura 7. Árbol genealógico que representa la familia del paciente con el código 1025 (IV:I).....33
- Figura 8. Secuenciación del exón 2 del gen *GJB1* del paciente con el código 1025, donde se observa el cambio heterocigoto 37G>A.....33
- Figura 9. Árbol genealógico que representa la familia del paciente con el código 1052 (IV:VIII).....35
- Figura 10. Secuenciación del exón 4 del gen *GDAP1* del paciente con el código 1052, donde se observa el cambio heterocigoto 487 C>T.....35
- Figura 11. Secuenciación del exón 5 del gen *GDAP1* del paciente con el código 1052, donde se observa el cambio heterocigoto 581C>G.....35

Figura 12. Árbol genealógico que representa la familia del paciente con el código 1055 (III:VI).....	36
Figura 13. Análisis en el software Coffalyser, de los datos obtenidos de la técnica MLPA para la detección de la duplicación del gen <i>PMP22</i> , del paciente con el código 1055.	37
Figura 14. Totalidad de mutaciones detectadas en los genes <i>MPZ</i> , <i>MED25</i> , <i>GJB1</i> , <i>GDAP1</i> y <i>PMP22</i> , en familias costaricenses con CMT.....	41
Figura 15. Porcentaje de mutaciones causantes de CMT, detectadas en los genes <i>MPZ</i> , <i>MED25</i> , <i>GJB1</i> , <i>GDAP1</i> y <i>PMP22</i> , halladas en este estudio.....	42
Figura 16. Análisis de coordenadas principales utilizando 57 variables para mostrar la similitud fenotípica de los pacientes con mutaciones en los genes <i>MPZ</i> , <i>PMP22</i> , <i>GJB1</i> , <i>MED25</i> y <i>GDAP1</i>	43
Figura 17. Similitud de la sintomatología de cada paciente según la mutación detectada a través del método de análisis de Coordenadas Principales.....	44
Figura 18. Distribución de mutaciones en países asiáticos, europeos y USA en pacientes con CMT1.....	47
Figura 19: Prevalencia de CMT en países industrializados.....	48
Figura 20. Clave dicotómica generada para realizar la estrategia de seguimiento de búsqueda de mutaciones en pacientes con CMT.....	57

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANOSIM	Análisis de Similitudes
ARN	Ácido Ribonucleico
CMT	Charcot Marie Tooth
CMT1	Charcot Marie Tooth de tipo Desmielinizante
CMT2	Charcot Marie Tooth de tipo Axonal
CMT2B	Charcot Marie Tooth de tipo Axonal y Autosómica Recesiva
CMT4	Charcot Marie Tooth de tipo Desmielinizante y Autosómica Recesiva
CMTX	Charcot Marie Tooth ligada al Cromosoma X
Cs	Cromosoma
Cx32	Conexina 32
EGR2	Proteína de Respuesta de Crecimiento Precoz 2
GDPA1	Proteína Asociada a Diferenciación Inducida por Gangliósidos
GJB1	Proteína de Unión entre Células
HMSN	Neuropatía Hereditaria Motora y Sensitiva
MED25	Subunidad 25 del Complejo Mediador de la Transcripción Polimerasa II
MFN2	Proteína Mitofusina 2

MLPA	Amplificación Múltiple Dependiente de Sonda
MPZ	Proteína Mielina Cero
MSC	Células Mesenquimales
MTMR2	Proteína Relacionada con la Miotubularina 2
NCBI	Centro Nacional de Información de Biotecnología
NDRG1	Regulador de la Corriente N-myc 1
PAST	Programa de análisis de estadística
PCoA	Análisis de Coordenadas Principales
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PMP22	Proteína Mielina Periférica 22
P0	Proteína Mielina Cero
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
NCV	Velocidad de Conducción Nerviosa

1. ANTECEDENTES

La enfermedad de Charcot Marie Tooth (CMT), fue descrita por primera vez en 1886 por tres médicos, Jean-Martin Charcot y Pierre Marie en Francia y Howard Henry Tooth en Inglaterra, de los cuales deriva su nombre. Es la enfermedad hereditaria del sistema nervioso periférico más común y presenta una prevalencia estimada de 1 en 2500 – 5000 (Skre 1974). Esta enfermedad también es conocida como neuropatía hereditaria motora y sensitiva (HMSN) o atrofia muscular del peroneo (debido a la degeneración del músculo peroneal en la parte inferior de la pierna).

CMT es provocada por daños progresivos en el sistema nervioso periférico, el cual está compuesto por células neuronales que transportan información a diversos puntos del cuerpo, por medio de señales eléctricas que viajan a través del axón. Para mantener e incluso aumentar la velocidad con la cual viajan estas señales eléctricas, los axones deben permanecer recubiertos de la proteína mielina, la cual es producida por las células de Schwann (Kwon *et al.* 2009, Maier *et al.* 2002).

Las mutaciones que disparan el desarrollo de la enfermedad se han podido localizar en genes expresados en células neuronales y de Schwann. Por tal motivo, se puede ver comprometida la estructura y funcionalidad del axón y en consecuencia la degeneración progresiva en los nervios y disminución de las señales nerviosas. Además, se manifiestan complicaciones durante la producción y compactación de las capas de mielina alrededor del axón, impidiendo que los impulsos nerviosos viajen adecuadamente a través del sistema neuronal (Maier *et al.* 2002).

Para comprender adecuadamente esta enfermedad, es necesario hacer una revisión de la fisiología normal de los nervios periféricos.

1.1. Fisiología del Sistema Nervioso Periférico

Las neuronas periféricas son células formadas básicamente por un cuerpo central, unas terminaciones llamadas dendritas, que permiten la comunicación entre neuronas, y una larga prolongación de la célula conocida como axón, que permite que viajen las señales por largas distancias a través del sistema nervioso (Ira 2008).

El axón se encuentra recubierto por capas de mielina generadas por las células de Schwann, estas capas forman una espiral multilamelar que median el agrupamiento y separación de los canales de sodio en la membrana axonal, permitiendo una eficiente conducción saltatoria a través de las regiones excitables del axón llamadas nodos de Ranvier (Maier *et al.* 2002, Schrer & Wrabetz 2008).

Las neuronas del sistema nervioso periférico realizan diferentes funciones: las de tipo motor producen la contracción de la musculatura como respuesta de una señal enviada desde el SNC. Por otra parte, los eventos externos son captados por las neuronas periféricas de tipo sensorial y enviados a través de estímulos nerviosos al SNC. La mayoría de los nervios periféricos son mixtos, o sea que contienen axones de tipo motor y de tipo sensorial (Ira 2008, Tsao *et al.* 2008).

Durante el progreso de la enfermedad de CMT, se ha observado que ambos tipos de neuronas se ven comprometidas, provocando en muchos casos serios daños a las extremidades inferiores y superiores del paciente. Este inadecuado funcionamiento se debe a que muchas de las proteínas que participan en la regulación de esta conducción nerviosa motora y sensitiva (tales como las proteínas PMP22, MPZ y GJB1), forman una parte muy importante en el proceso de compactación de la mielina en las células periféricas (Shy *et al.* 2002). Se ha comprobado que los genes que codifican para las proteínas anteriormente mencionadas son susceptibles a mutaciones que provocan el desarrollo de la enfermedad de CMT (Banch *et al.* 2005) (Fig 1).

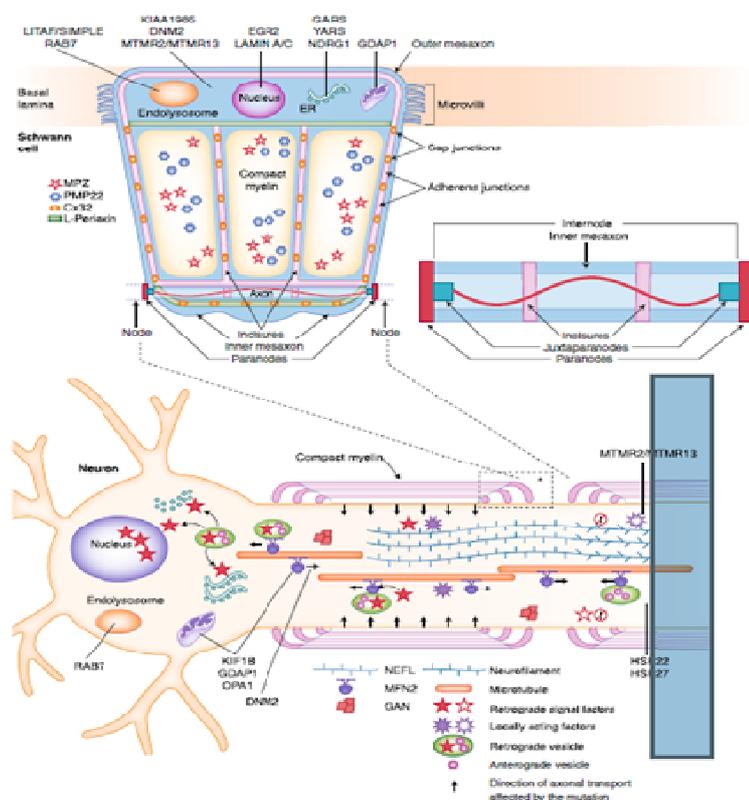


Figura 1. Componentes proteicos de una célula neuronal periférica y de las células de Schwann, involucrados con la presencia de la enfermedad CMT. GJB1, MPZ, PMP22 participan en procesos de compactación de la mielina de las células de Schwann y la proteína GDAP1 está relacionada con procesos mitocondriales tanto en las células de Schwann como en la neurona periférica. (Patzkó & Shy 2011).

1.2. Manifestaciones Clínicas

En general, CMT se caracteriza por una debilidad muscular progresiva que culmina con atrofia principalmente en los músculos distales de las piernas, y con un déficit sensorial por la reducción de reflejos en los tendones. Posteriormente se presentan síntomas similares en las extremidades superiores y atrofia de los músculos palmares menores (Pareyson 2004).

Muchos de los pacientes con CMT presentan rigidez en sus articulaciones en la primera o segunda década de sus vidas, lo cual provoca una lenta deformidad en los pies donde los dedos se empiezan a torcer, causando la forma más común de deformidad que consiste en un pie acortado con arco elevado (*pes cavus*) (Claramunt *et al.* 2005). Estas deformidades ocasionan problemas para caminar, ya que la estructura del pie cambia provocando una fricción inusual contra los dedos del pie, el tobillo, el talón y el antepié, produciendo en algunos casos dolor al caminar (Pareyson 2004).

Además, se presenta un fenómeno conocido como marcha en *steppage*, que consiste en caminar levantando las piernas más de lo común, debido a que la fuerza de los músculos distales es muy débil, por lo que la persona se ve obligada a levantar sus pies con la fuerza de los músculos anteriores. Adicionalmente se suelen presentar síntomas como dificultad para correr, dedos en forma de martillo, torsión del tobillo, problemas para manipular objetos con las manos, así como tremor, calambres y sensaciones de frío-calor (Pareyson & Marchesi 2009).

Por lo demás, las características clínicas son muy heterogéneas, incluso se han observado grandes diferencias entre pacientes de una misma familia; por ejemplo, un individuo puede presentar síntomas de debilidad y atrofia severa de los músculos de los pies y manos, y un pariente suyo con la misma mutación genética puede no manifestar tal severidad (Reilly & Hanna 2002).

1.3. Diagnóstico de CMT

La debilidad en las extremidades inferiores y pequeñas deformidades son las primeras señales para sospechar del padecimiento de CMT, por lo que se prosigue a realizar una exploración física principalmente para ver los reflejos en el paciente, así como un análisis de la historia clínica y familiar del paciente (Reilly 2009).

Posteriormente, se realizan otros análisis de confirmación, como la prueba de velocidad de conducción en los nervios (NCV) y electromiografía, en las cuales se mide la velocidad de impulsos eléctricos a través del nervio, si se da una respuesta retrasada es una señal de desmielinización (CMT1) y respuestas normales o ligeramente reducidas dan sospecha de axonopatía (CMT2) (Pareyson & Marchesi 2009). Así mismo se ha implementado el análisis de biopsias para determinar si existe daño en la neurona en el axón o en la mielina.

Sin embargo, con la identificación de gran parte de los genes implicados en el desarrollo de CMT, el diagnóstico y la clasificación más precisos se lleva a cabo en los laboratorios de genética molecular (Szigeti & Lupski 2009).

1.4. Tratamiento

Existen algunas formas de retardar los daños sufridos en los pacientes con CMT y una de las formas más efectivas es la terapia física, que ofrece un programa de ejercicios de impacto leve y estiramiento para evitar que los músculos se aprieten y produzcan contracturas.

Las contracturas de los pies también pueden retrasarse con el uso de tablillas para prevenir la flexión que tiende a tomar los dedos y también utilizar zapatos ajustados para mejorar la marcha. En muchas ocasiones estos métodos fallan y ocurren contracturas severas, por lo que debe recurrirse a la cirugía para relajar los músculos y tendones tensos, corregir las deformidades de los huesos y escoliosis avanzada (Ward *et al.* 2008).

Hasta el momento no existe ningún tratamiento que proporcione la cura en los pacientes con CMT, pero en diversas partes del mundo se está realizando experimentación para comprender las funciones de los genes implicados en el desarrollo de CMT y proponer mejores terapias.

Entre ellos, cabe mencionar que se han realizando experimentos con medicamentos como onapristone, un antagonista de la progesterona, ya que se ha comprobado en estudios *in vitro* que esta hormona incrementa la expresión de *MPZ* y *PMP22*, aunque este antagonista ha resultado ser tóxico, este hallazgo es importante, ya que se pueden utilizar otros antagonistas de la hormona para la terapia (Pareyson & Marchesi 2009).

La Neurotrofina 3 es un factor que promueve el crecimiento axonal, en análisis en ratas y posteriormente en humanos demostraron una disminución de la pérdida sensorial al suministrar este medicamento. También se ha utilizado en modelos animales el ácido ascórbico, el cual ha favorecido la remielinización, se cree que esto se debe a que actúa reduciendo los niveles de ARNm de *PMP22* en ratones con *CMT1A* (Pareyson & Marchesi 2009, Visser & Verhamme 2011).

Sin embargo, un estudio publicado recientemente reporta que no hay un efecto significativo en la mejora de la neuropatía ante la suplementación de ácido ascórbico, comparado con pacientes que recibieron placebo durante un periodo de dos años con *CMT1A* (Pareyson *et al.* 2011).

A pesar de todas estas investigaciones, no se conoce muy bien los verdaderos resultados que estos medicamentos pueden desencadenar en los pacientes con *CMT*. Sin embargo, se ha visto que con estilos de vida apropiados se puede retardar el progreso de la enfermedad y mientras más temprano sea el inicio de estos tratamientos, el resultado será mejor (Pareyson & Marchesi 2009).

Las células mesenquimales adultas (MSC) ofrecen una alternativa terapéutica, ya que tienen una gran capacidad para realizar procesos de remielinización de células nerviosas, poseen un efecto antiapoptótico, neuroprotector y también participan en la inhibición de cuadros inflamatorios, es por esto que las MSC muestran una posible cura para las neuropatías que provoquen desmielinización y por lo tanto podría ser una solución para *CMT* de tipo 1 (Leal *et al.* 2008, Patzkó & Shy 2011).

1.5. Clasificación de la enfermedad CMT

La enfermedad CMT se ha dividido según los criterios electrofisiológicos y patológicos en dos tipos principales: la forma desmielinizante o tipo I, que se ha caracterizado principalmente por una velocidad de conducción en el nervio (NCV) menor a 38 m/s debido a una degeneración de la mielina, que forma la envoltura en los nervios periféricos (Banchs *et al.* 2009); y la de tipo axonal o tipo II, que es caracterizada por una degeneración preferencial del axón y una ligera reducción en la amplitud de NCV. Existe un tercer tipo que muestra un fenotipo intermedio o mixto de la enfermedad, y presenta valores de NCV en un rango entre 25-45 m/s, y daños tanto en la mielina y como en el axón (Banchs *et al.* 2009).

Debido a la alta heterogeneidad genética que presenta esta enfermedad, se pueden observar en las familias con CMT patrones de segregación mendeliana autosómicos dominantes, recesivos y ligados al cromosoma X (Szigeti & Lupski 2009).

En virtud de lo anterior, es que se ha clasificado la enfermedad de CMT en subtipos. La CMT1 se caracteriza por presentar la forma desmielinizante de la enfermedad, en conjunto con un patrón de herencia autosómico dominante, y se presenta en el 80% de los pacientes con la enfermedad (Leal 2004). La CMT2 se hereda de igual forma, pero es de tipo axonal. La CMT4 suele caracterizarse por ser desmielinizante y se hereda de forma autosómica recesiva, mientras que la CMT2B2 es de tipo axonal y con el mismo patrón mendeliano (Leal *et al.* 2009). Por último, existe el subtipo generalmente con herencia dominante, ligada al cromosoma X y de tipo intermedio el cual es conocido como CMTX (Cuadro. 1) (Banchs *et al.* 2009, Patzkó & Shy 2011, Szigeti & Lupski 2009).

Cuadro 1. Clasificación de los genes en estudio, según los diferentes tipos de CMT.

Tipo de CMT	Tipo de Herencia	Desmielinizante/ Axonal	Algunos Genes Asociados
CMT1	Autosómico Dominante	Desmielinizante	<i>PMP22, MPZ</i>
CMT2B2	Autosómico Recesivo	Axonal	<i>MED25</i>
CMT4	Autosómico Recesivo	Desmielinizante	<i>GDAP1</i>
CMTX	Ligado al Cs X	Desmielinizante	<i>GJB1</i>

Sin embargo, el comportamiento de la enfermedad en cuanto al tipo de herencia y manifestación neuronal depende no solo del gen causante de padecimiento, sino, de la mutación que se encuentre involucrada, por ejemplo, las mutaciones el gen *GDAP1* generalmente presentan las características del tipo CMT4, pero algunas mutaciones pueden provocar un daño axonal o intermedio, así como en el gen *MPZ* que puede presentarse de forma intermedia y no desmielinizante como se ha caracterizado (Leal 2004, Pedrola *et al.* 2008).

1.6. Epidemiología Genética

En los estudios realizados en CMT se ha observado que la enfermedad se hereda principalmente de forma autosómica dominante, pero la segregación en todos los patrones de herencia han sido observados. Además, se ha podido determinar que existe una alta heterogeneidad genética en esta enfermedad, prueba de ello es que se han descrito más de 40 genes y loci adicionales que han sido relacionados con esta neuropatía (Patzkó & Shy 2011). Los genes mayormente implicados con la enfermedad son: *MTMR2*, *MFN2*, *EGR2* y *NDRG1*, *GJB1*, *GDAP1*, *PMP22*, *MPZ* y el gen *MED25*, este último solamente en Costa Rica.

Mutaciones en el gen *MTMR2* ubicado en el locus 11q23, producen el subtipo CMT4B de la enfermedad, el cual conlleva a una neuropatía

desmielinizante que se expresa de manera recesiva (Robinson *et al.* 2008). MTMR2 es sumamente importante en la regulación de transporte transmembrana en células neuronales, tanto en axones como en las áreas cubiertas de mielina que producen las células de Schwann (Bolino *et al.* 2004).

Se ha determinado que algunas mutaciones en el gen *MFN2*, ubicado en el locus 1p36, son responsables del subtipo CMT2A que es de tipo axonal; la proteína codificada por este gen llamada mitofusina 2 (*MFN2*) se encuentra en las membranas mitocondriales y está relacionada con procesos de mantenimiento de redes mitocondriales al igual que la proteína *GDAP1* (Engelfried *et al.* 2006).

En diversos estudios se ha revelado que la expresión de *MPZ* en las células de Schwann es dependiente de otras proteínas tales como la *EGR2*, lo cual evidencia que el gen *EGR2* ubicado en el locus 10q21 se encuentra asociado con la enfermedad, específicamente con el subtipo desmielinizante CMT1D que se heredada de forma autosómica dominante (Jones *et al.* 2007).

La proteína *NDRG1* es esencial para el mantenimiento de la mielina en los nervios periféricos, ya que una deficiencia de esta proteína resulta en una disfunción en las células de Schwann y consecuentemente se produce la desmielinización en las terminales nerviosas. En consecuencia, los pacientes con CMT4D presentan a corta edad los primeros síntomas de la enfermedad, la cual presenta un patrón recesivo (Okuda *et al.* 2008).

Por otra parte, más de 300 mutaciones se han encontrado en el gen *GJB1* en el locus Xq13 y todas ellas producen disminución de la función de la proteína conexina 32 en procesos de compactación de mielina, provocando CMT y pérdida de audición en los pacientes. Estas mutaciones producen el tipo CMTX de la enfermedad que es herencia ligada al sexo de expresión dominante y provoca daños a nivel de la mielina debido a su ubicación (González *et al.* 2005, Schrer y Wrabetz 2008). Sin embargo, recientemente se ha descubierto que anomalías

en el axón y defectos a nivel de transporte axonal preceden el evento de desmielinización en modelos de ratones de CMTX (Vavlitou *et al.* 2010).

Otro gen implicado es el gen *GDAP1* ligado al locus 8q21 que produce el subtipo CMT4A en el cual se pueden presentar neuropatías desmielinizantes, axonales e intermedias. Usualmente en las familias que se presentan mutaciones en este gen se evidencian patrones de herencia autosómicos recesivos, sin embargo, en algunas familias se ha reportado segregación autosómica dominante. Análisis proteicos revelan que la proteína GDPA1 se expresa en sistema nervioso central, médula espinal, glándulas tiroideas, pero específicamente se ha ubicado en las membranas mitocondriales externas de células neuronales y en células de Schwann, efectuando funciones de mantenimiento de la red mitocondrial de la célula (Nelis *et al.* 2002, Pedrola *et al.* 2008).

El gen *PMP22* se encuentra localizado en el cromosoma 17p11 y es uno de los genes mayormente implicado en el desarrollo de la enfermedad a nivel mundial. Se han encontrado mutaciones de punto en este gen, pero su duplicación de 1.5 Mb ha sido la más estudiada debido a que produce el tipo de enfermedad conocido como CMT1A, la cual constituye el tipo más frecuente y es heredada de forma autosómica dominante (Kwon *et al.* 2009). Sin embargo, en Costa Rica no se ha reportado ningún paciente afectado con CMT que presente la duplicación *PMP22* (Com. Pers. Alejandro Leal).

Este gen codifica para la proteína mielina periférica 22 (*PMP22*) y se ha propuesto que participa en mecanismos de proliferación celular, diferenciación y apoptosis, y se ha observado que al encontrarse sobre expresada hace que la estructura y la función de la capa de mielina sean anormales (efecto de dosis), produciendo la forma desmielinizante de la enfermedad. *PMP22* es altamente expresada en las células de Schwann y representa el 2.55% del total del contenido proteico en la membrana, por lo cual mutaciones y más aún la duplicación del gen que la codifica, provoca la aparición de neuropatías periféricas heredables. El

origen de la duplicación que causa la enfermedad, es atribuido a un intercambio desigual de las cromátidas durante el proceso de meiosis (Hernández & Arenas 2008, Myers *et al.* 2008).

Además, un estudio en ratones transgénicos CMT1A revela que la proteína PMP22 no solo realiza funciones de mantenimiento de la estructura de la mielina, también es capaz de controlar el proceso final de maduración de las células de Schwann, para la formación de las capas de mielina (Robaglia *et al.* 2002).

La variante CMT1B parece ser menos frecuente y se debe a mutaciones en el gen *MPZ*; este gen codifica la proteína mielina zero (MPZ o P0), se ha sugerido que ejerce un papel estructural en la formación de las vainas de mielina, colaborando con su mantenimiento y compactación, ya que es la proteína periférica más abundante en las células nerviosas. Este gen se encuentra localizado en la región cromosómica 1q22.23 y en él se han identificado diversas mutaciones (Bienfait *et al.* 2006, Santoro *et al.* 2004).

Se han reportado más de 100 mutaciones en el gen *MPZ*, donde los pacientes no solo presentan fenotipos desmielinizantes sino también axonales o intermedios, tal es el caso de la mutación Thr124Met que presenta deficiencias de tipo axonal (Kurihara *et al.* 2004, Gallardo *et al.* 2009). La transversión 434A>C ubicada en el exón 3 del gen *MPZ*, provoca un cambio del aminoácido Tyrosina en el codón 145 por una Serina y produce la forma intermedia de la enfermedad (Leal *et al.* 2003).

Las dos mutaciones en el gen *MPZ* mencionadas anteriormente, han sido encontradas en familias costarricenses. La mutación Thr124Met es la responsable de la enfermedad en una familia con cinco individuos afectados, todos ellos de forma heterocigota (Leal 2004).

Por otra parte, la mutación Tyr145Ser provoca un cambio de aminoácido en el dominio extracelular de *MPZ*; presenta un fenotipo intermedio y se hereda de

forma autosómica dominante, fue encontrada en cuatro afectados con genotipo heterocigota y en dos hijos afectados de estos portadores heterocigotos se determinó el estado homocigoto de la mutación, presentando características clínicas más severas que los heterocigotos. Esta mutación fue identificada por primera vez en Costa Rica y hasta ahora únicamente para este país ha sido reportada (Leal 2004).

Leal y colaboradores (2001) encontraron en una familia consanguínea de Palmares de Alajuela en Costa Rica, el segundo locus ligado a la enfermedad de CMT con un patrón de herencia autosómico recesivo y de tipo axonal (CMT2B2), en la región cromosómica 19q13.3 donde se identificó en el exón 9 del gen *MED25*, la mutación Ala335Val que se encontró en estado homocigota en 18 individuos afectados. En un estudio posterior, en el cantón de Palmares se determinó que el alelo mutado se encuentra presente en un 6% de la población (Leal *et al.* 2001, Rojas *et al.* 2009).

La proteína codificada por este gen es la subunidad 25 del complejo mediador de la transcripción por ARN polimerasa II que juega un papel importante como un coactivador clave en la activación de la transcripción; la alteración de la función normal de la proteína MED25 o disminución de su función, puede afectar la activación transcripcional de genes importantes en las células periféricas, tal es el caso del gen *PMP22* (Leal *et al.* 2009).

Se logró determinar a través de la construcción de las genealogías de cada individuo que porta la mutación en el gen *MED25*, un ancestro común proveniente de España de la ciudad de Badajoz (Com. Pers. Alejandro Leal). Las investigaciones realizadas años atrás en nuestro país, han logrado identificar algunas de las mutaciones responsables de la enfermedad de CMT, pero es necesaria la búsqueda de más mutaciones responsables de este padecimiento, debido a que en muchos de los pacientes aún no se ha detectado la causa genética.

2. JUSTIFICACIÓN

Esta investigación se centra en la identificación molecular de la neuropatía hereditaria motora y sensorial más común a nivel mundial. Mutaciones en los genes *MED25*, *MPZ*, *GJB1*, *GDAP1* y la duplicación del gen *PMP22* serán buscadas en pacientes afectados con CMT en nuestro país, con el fin de determinar la importancia de cada una de las mutaciones en dicha población.

Adicionalmente se realizarán análisis clínicos y electrofisiológicos a los participantes, con el fin de correlacionar los síntomas con la mutación causante de CMT. Esto con el fin de evaluar la posibilidad de desarrollar una estrategia de búsqueda molecular según sean los síntomas del paciente.

Para este estudio se han escogido los principales genes hasta ahora implicados en la enfermedad, así como el exón 9 del gen *MED25* donde se encuentra la mutación Ala335Val, que hasta ahora sólo se ha encontrado relacionado con CMT en una familia extensa de Costa Rica (Rautenstrauss *et al.* 2010).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Determinar las mutaciones presentes en los genes *MPZ*, *MED25* (exones 8 y 9), *GJB1*, *GDAP1* y la duplicación del gen *PMP22* en individuos costarricenses afectados con la enfermedad de CMT, así como establecer la correlación entre el genotipo y fenotipo de la enfermedad en los pacientes

3.2. Objetivos Específicos

- Buscar mutaciones en los genes *MPZ*, *MED25*, *GJB1*, y *GDAP1* y la duplicación del gen *PMP22* en individuos con CMT de la población costarricense.
- Evaluar las características fenotípicas en los pacientes que presentan mutaciones en los genes *MPZ*, *MED25*, *GJB1*, y *GDAP1* y la duplicación del gen *PMP22*.
- Determinar si existe correlación genotipo-fenotipo en los pacientes en los que se encuentre mutaciones en los genes analizados.
- Establecer una estrategia de búsqueda del gen responsable de la enfermedad en la población costarricense, según el fenotipo que muestre el paciente.

4. METODOLOGÍA

4.1. Participantes

En este estudio participaron 51 individuos con la enfermedad de CMT, diagnosticados en los servicios de neurología y fisiatría de diferentes hospitales de la Caja Costarricense del Seguro Social y de hospitales privados, con base en los resultados de electromiografía y prueba de conducción de la velocidad nerviosa. Las muestras fueron tomadas durante el primer semestre del año 2011; los análisis de laboratorio y sus resultados fueron realizados durante el segundo semestre del mismo año.

Se explicó a los pacientes el propósito del estudio y se realizó el consentimiento/asentimiento informado aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Costa Rica, posteriormente obtuvo la muestra de sangre periférica para realizar los análisis respectivos y realizar la entrega de resultados y la respectiva asesoría genética. Este procedimiento fue realizado en la Escuela de Biología de la UCR, por los profesionales a cargo.

Son parte del estudio aquellos pacientes de cualquier edad, etnia y sexo, que no presenten otro tipo de neuropatía periférica o tengan una probabilidad aumentada a desarrollar una neuropatía periférica no hereditaria por otra enfermedad o por consumo de neuromoduladores. A cada muestra se la asignará un código para mantener el orden y la confidencialidad de la información de los pacientes.

Cuadro 2. Información de los pacientes (código, edad, sexo y procedencia de cada paciente) evaluados en esta investigación.

Código del Paciente	Edad	Sexo	Provincia
023	28	F	Alajuela
043	42	M	San José
1001	48	M	San José
1003	51	M	Alajuela
1005	53	F	Puntarenas
1007	60	M	San José
1009	16	F	Cartago
1011	33	M	San José
1012	77	M	San José
1013	39	M	San José
1015	58	F	San José
1016	68	F	San José
1017	54	F	Alajuela
1019	15	F	Cartago
1020	67	F	San José
1023	29	F	San José
1024	65	M	Guanacaste
1025	39	F	San José
1026	51	M	San José
1027	36	M	Alajuela
1028	44	F	San José
1029	37	F	Heredia
1030	47	M	Cartago
1031	64	M	San José

1034	24	F	San José
1035	67	M	San José
1036	17	M	Cartago
1037	42	F	San José
1038	36	F	San José
1039	59	F	Limón
1040	30	M	San José
1041	29	F	San José
1042	29	M	San José
1043	54	M	Alajuela
1044	60	M	San José
1045	61	F	San José
1046	39	M	Cartago
1047	38	F	Alajuela
1048	28	M	San José
1049	14	M	Cartago
1050	66	M	San José
1051	42	F	San José
1052	18	M	San José
1053	13	F	Cartago
1054	18	M	San José
1055	11	F	Cartago
1056	9	M	Cartago
1057	22	F	Alajuela
1058	40	M	San José
1060	4	F	Alajuela
1061	5	F	Heredia
1064	45	M	Heredia

4.2. Obtención de Muestras de sangre

Se obtuvo una muestra de 4 ml de sangre periférica venosa del antebrazo de los probandos, que se utilizó únicamente para el análisis de mutaciones de la enfermedad de CMT; la muestra se tomó en un tubo con anticoagulante EDTA K₃.

4.3. Extracción y cuantificación del ADN

Las muestras de sangre se procesaron según modificaciones realizadas al protocolo de extracción de ADN genómico de Miller y colaboradores (1988). El ADN se almacenó en el Laboratorio 240 de Genética Molecular Humana de la Escuela de Biología de la UCR.

4.4. Análisis Molecular

4.4.1. Análisis de mutaciones en el gen *MED25*

Se realizó una amplificación de las muestras de ADN de los exones 8 y 9 del gen *MED25* por medio de la técnica de PCR, con las siguientes condiciones:

Programa de PCR

95°C	5 min	
95°C	30 seg	} 35x
60°C	30 seg	
72°C	35 seg	
72 °C	7 min	
Hold	4 °C	

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando la enzima ADN Polimerasa de Biotools Labs mediante la siguiente reacción:

Reactivo	Volumen (µl)
Amortiguador 10x	5
dNTPs	1
Iniciador Directo	0.4
Iniciador Reverso	0.4
ADN Polimerasa	1
Agua	41.2
ADN	1
Total	50 µl

Para lograr la amplificación de los exones 8 y 9 del gen *MED25* se utilizó los iniciadores directo 5'- GTGTGACCTCGTGGGATACC-3' y reverso 5'- CTCTAACTGTCCTAGCTGTGG-3'.

4.4.2. Análisis de mutaciones en el gen *MPZ*

Se realizó una amplificación de las muestras de ADN del gen *MPZ*, mediante la técnica de PCR, con las siguientes condiciones

Programa de PCR

Exón 1

95°C 5 min
 95°C 30 seg }
 60°C 30 seg } 35x
 72°C 30 seg }
 72 °C 7 min
 Hold 10 °C

Programa de PCR

Exón 2

95°C 5 min
 95°C 30 seg }
 55°C 30 seg } 35x
 72°C 30 seg }
 72 °C 7 min
 Hold 10 °C

Programa de PCR**Exón 3**

95°C 5 min
 95°C 30 seg }
 58°C 30 seg } 35x
 72°C 30 seg }
 72 °C 7 min
 Hold 10 °C

Programa de PCR**Exón 4**

95°C 5 min
 95°C 30seg }
 60°C 30 seg } 35x
 72°C 30 seg }
 72 °C 7 min
 Hold 10 °C

Programa de PCR**Exón 5 y 6**

95°C 5 min
 95°C 30 seg }
 58°C 30 seg } 35x
 72 °C 7 min }
 Hold 10 °C

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando la enzima ADN Polimerasa de Biotools Labs, mediante la siguiente reacción:

Reactivo	Volumen (µl)
Amortiguador 10x	5
dNTPs	1
Iniciador Directo	0.4
Iniciador Reverso	0.4
ADN Polimerasa	1
Agua	41.2
ADN	1
Total	50 µl

Cuadro 3: Iniciadores utilizados para la amplificación del gen *MPZ*

	Directo	Reverso
Iniciadores Exón 1	5'- CCACCTCTCAACTGCACATG-3'	5'- ATTGCTGAGAGACACCTGAGTCC-3'
Iniciadores Exón 2	5'- TCCTCTGTATCCCTTACTGG-3'	5'-TTTGAAGCACTTTCTGTTATCC-3'
Iniciadores Exón 3	5'- GGAGCTAAGCTTTGACAGCTGTG-3'	5'- ATCCCCTCCCAAAGTCTTC-3'
Iniciadores Exón 4	5'- CGGACTAGGAACCCACAGATA-3'	5'-TCCGCCAGATGGGGGATAG-3'
Iniciadores Exón 5 y 6	5'- TGTGTCCGCGGTGCAAGGGGTTC-3'	5'- CTTTGGGCCTTTGGCGGACTC-3'

4.4.3. Análisis de las mutaciones del gen *GJB1*

Se realizó una amplificación de las muestras de ADN del exón 2 (único exón codificante) del gen *GJB1* en *MPZ*, mediante la técnica de PCR, con las siguientes condiciones:

Programa de PCR

Exón 2

95°C 5 min

95°C 30 seg
 60°C 30 seg } 35x
 72°C 30 seg }

72 °C 7 min

Hold 10 °C

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando la enzima ADN Polimerasa de Biotools Labs, mediante la siguiente reacción:

Reactivo	Volumen (µl)
Amortiguador 10x	5
dNTPs	1
Iniciador Directo	0.4
Iniciador Reverso	0.4
ADN Polimerasa	1
Agua	41.2
ADN	1
Total	50 µl

Para lograr la amplificación se utilizó los iniciadores directo 5'-CCAGCTTTCTGACAGCTTGCT-3' y reverso 5'-CTCAAACAACAGCCGGAACAC-3'.

4.4.4. Análisis de las mutaciones en el gen *GDAP1*

Se realizó una amplificación de las muestras de ADN de los exones 1, 2, 3, 4, 5 y 6 del gen *GDAP1*, mediante la técnica de PCR, con las siguientes condiciones

Programa de PCR

Exón 1

95°C 5 min
 95°C 30 seg }
 63°C 30 seg } 40x
 72°C 40 seg }
 72 °C 7 min
 Hold 10 °C

Programa de PCR

Exón 2

95°C 5 min
 95°C 30 seg }
 53°C 30 seg } 40x
 72°C 30 seg }
 72°C 7 min
 Hold 10 °C

Programa de PCR**Exón 3**

95°C 5 min
 95°C 30 seg }
 58°C 30 seg } 35x
 72°C 30 seg }
 72 °C 7 min
 Hold 10 °C

Programa de PCR**Exón 4**

95°C 5 min
 95°C 30 seg }
 53°C 30 seg } 35x
 72°C 30 seg }
 72°C 7 min
 Hold 10 °C

Programa de PCR**Exón 5**

95°C 5 min
 95°C 30 seg }
 54°C 30 seg } 35x
 72°C 30 seg }
 72 °C 7 min
 Hold 10 °C

Programa de PCR**Exón 6**

95°C 5 min
 95°C 30 seg }
 63°C 30 seg } 35x
 72°C 30 seg }
 72°C 7 min
 Hold 10 °C

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando la enzima ADN Polimerasa de Biotools Labs, mediante la siguiente reacción:

Reactivo (exones 1, 2, 5 y 6)	Volumen (µl)
Amortiguador 10x	5
dNTPs	1
Iniciador Directo	0.4
Iniciador Reverso	0.4
ADN Polimerasa	1
Agua	41.2
ADN	1
Total	50 µl

Reactivo (exón 3)	Volumen (µl)
Amortiguador 10x	5
dNTPs	1
Iniciador Directo	0.6
Iniciador Reverso	0.6
ADN Polimerasa	1
Agua	40.8
ADN	1
Total	50 µl

Reactivo (exón 4)	Volumen (µl)
Amortiguador 10x	2.5
dNTPs	0.5
Iniciador Directo	0.2
Iniciador Reverso	0.2
ADN Polimerasa	0.5
Agua	20.1
ADN	1
Total	25 µl

Cuadro 4. Iniciadores utilizados para la amplificación del gen *GDAP1*

	Directo	Reverso
Exón 1	5'- GCCCTTCATAACCAGGGTCTC -3'	5' -GCCCGATCCGCGCCACCCTCCG -3'
Exón 2	5'- GGCTGCTTAGCGGTGTCCAGGG -3'	5'- GGGAACACATAGTTGTGTTG -3'
Exón 3	5'- GCTTTTGAGTGTAACAACATCATG -3'	5'- GACCATGAGACATGCTAGGTC -3'
Exón 4	5' CAGGGTAAGCCCAAGGCAGAG -3'	5'- GTAGAACATTTACTCCGTGCAG -3'
Exón 5	5'- GGCTGAACTCTGTAAGATTTG -3'	5'- GACCTAAGAATGTTCCCATG -3'
Exón 6	5'- GAGACCACTGATACCAGCTGG-3'	5'- CAGAGAGCCACGGGCAATCAC -3'

Para el análisis de cada uno de los genes anteriormente mencionados, se evaluó el producto de amplificación de PCR por medio de electroforesis en geles

de agarosa al 1% y en cada gel se cargó un marcador de peso molecular (Gen Ruler 50pb DNA ladder. Fermentas) para verificar el peso de cada banda. Este procedimiento se realizó en el Laboratorio de Genética y Medicina Molecular del Instituto de Biomedicina, Valencia, España.

Se procedió con la purificación de los productos de PCR, con el “Kit” de purificación a través de esferas magnéticas “Nucleo Mag”, de Macherey-Nagel. La reacción de secuenciación se realizó usando la química de Applied Biosystems Big Dye v3.1 (Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit). La purificación de las reacciones de secuenciación se realizó con el Kit de esferas magnéticas “Gene Mag Sequence” de Chemicell, y se procesaron en el Secuenciador ABI3730 DNA analyzer de Applied Biosystems. Los resultados fueron analizados en el programa Chromas v2.33 de Technelysium y el alineamiento de las secuencias se realizó con el programa “Blast” del NCBI.

Todos los procedimientos anteriormente mencionados son utilizados actualmente en el Laboratorio de Genética y Medicina Molecular del Instituto de Biomedicina, Valencia, España, para el diagnóstico de mutaciones de CMT.

4.4.5. Análisis de la duplicación del gen *PMP22*

Se realizó la detección de la duplicación en el gen *PMP22* por medio de la técnica MPLA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Se procedió a desnaturalizar el ADN y realizar la hibridación de las sondas específicas a la hebra de ADN simple banda, estas sondas consisten en dos tipos de oligonucleótidos: uno sintético con iniciador no marcado en el extremo 5' y otro con iniciador marcado con un fluorocromo diferente para cada sonda en el extremos 3'. Se realizó el ligado de las sondas hibridadas con la enzima ligasa y posteriormente se hizo uso de un solo juego de iniciadores para amplificar las secuencias correspondientes a las sondas hibridadas (Fig. 2).

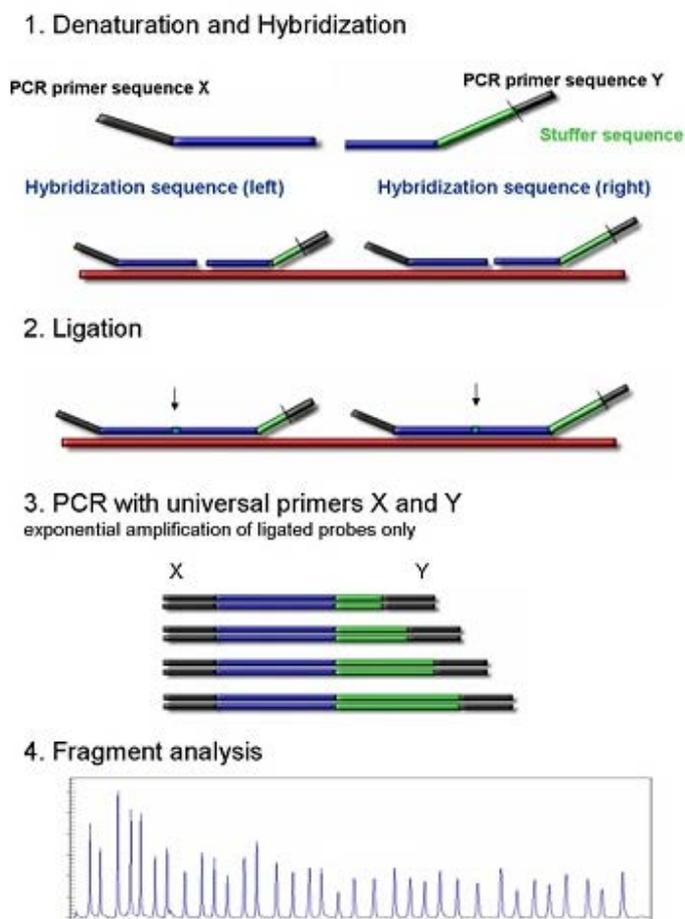


Figura 2. Procedimiento para realizar el análisis de la duplicación del gen *PMP22* con la técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).

La determinación de las duplicaciones en cada muestra de ADN se llevó a cabo en el Secuenciador ABI3730 DNA analyzer de Applied Biosystems. El análisis de los datos se realizó en el software Coffalyser de MRC-Holland. Este procedimiento se realizó en el Laboratorio del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras en el Hospital La Fe de Valencia, España.

4.5. Correlación Genotipo/ Fenotipo

A los pacientes que se les encontró mutación en alguno de los genes evaluados, se procedió a realizar un estudio clínico que incluyó la recopilación de antecedentes familiares, padecimientos actuales del paciente, exploración física según la semiología neurológica (Fuller 2010), y una recopilación de información tanto personal como referente a la enfermedad (Anexo 2). Dos pacientes con una mutación en el gen *MPZ*, detectadas en estudios anteriores fueron tomadas en cuenta, para el análisis de correlación fenotipo-genotipo. Este procedimiento fue realizado en diciembre de 2011, en el Servicio de Neurología del Hospital Nacional de Niños, por Alejandra Acosta Gualandri, médico Pediatra y Alfonso Gutiérrez Mata, Pediatra Neurólogo del Hospital Nacional de Niños.

Se procedió a realizar el análisis de correlación genotipo-fenotipo a través de análisis exploratorios de los datos genotípicos y fenotípicos (se evaluaron 57 variables fenotípicas) (Fuller 2010) (Anexo 4), por medio de la técnica de ordenación de Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), para mostrar la similitud de los pacientes en cuanto al juego de variables fenotípicas, utilizando matrices mixtas en el software PAST, basadas en el índice de Gower para las variables multiestado (o variables que muestran diferente grado o nivel expresión), índice de Bray-Curtis para datos cuantitativos como lo es la edad; y el índice de Dice, para las variables de presencia-ausencia de la característica fenotípica (Legendre & Gallagher 2001, Barboza *et al.* 2012).

Las variables fenotípicas fueron incluidas en la gráfica del PCoA, calculando sus coordenadas en la gráfica mediante el índice de Pearson, para las variables cuantitativas y el de Spearman para las variables multiestado o de presencia-ausencia (Legendre & Gallagher 2001, Barboza *et al.* 2012).

Aunque el tamaño de la muestra es limitado por el problema de abordaje a un número grande de pacientes, se realizó análisis de Similitudes (ANOSIM), con 10.000 permutaciones para evaluar estadísticamente la correlación genotipo-

fenotipo según el coeficiente R ($R=1$ significa que los grupos son completamente diferentes), el cual determina el nivel de diferencia entre grupos (cada grupo está conformado por los pacientes que presentaron alguna mutación según el gen evaluado), esta prueba revela un nivel de significancia, cuando los pacientes con mutación dentro de cada gen son más similares en su fenotipo que si se comparan con pacientes con mutaciones en otro de los genes evaluados (Barboza *et al.* 2012, Clarke & Warwick 1994).

Todos los análisis anteriormente mencionados se llevaron a cabo en el programa PAST (PAleontological STatistics) (Hammer *et al.* 2001).

4.6. Establecimiento de estrategia de diagnóstico

Con base en la metodología establecida para la amplificación de los exones de cada gen analizado y de la estrategia de búsqueda establecida según la correlación fenotipo-genotipo, se procedió a realizar un protocolo que será utilizado en el diagnóstico de la enfermedad de CMT en las familias costarricenses que se acerquen al diagnóstico molecular.

5. RESULTADOS

5.1. Mutación en el gen *MED25*

Se encontró en 1 paciente masculino de 36 años de edad, la mutación Ala335Val en el gen *MED25* (1004C>T) en estado homocigoto (Fig.4), (Fig. 15); y en 3 pacientes no emparentados, se determinó la presencia de la mutación en estado heterocigoto.

El paciente homocigoto II:II (Fig. 3), el cual además presenta diabetes, mostró una edad de inicio de los síntomas de la enfermedad a los 29 años; los primeros síntomas de CMT fueron debilidad en su pie derecho, así como tropiezos y caídas frecuentes. Durante los próximos 5 años la enfermedad evolucionó lentamente, pero durante el último año el avance de la enfermedad principalmente en las extremidades superiores ha sido muy rápido. Según los estudios neurológicos se determinó la presencia de CMT mixta con predominancia neuroaxonal.

Actualmente, el paciente presenta problemas en la marcha y equilibrio (*stepagge*), pérdida de la movilidad en sus articulaciones, tremor en las manos, dolor, adormecimiento y adelgazamiento de miembros superiores e inferiores, además, características como los pies con dedos de martillo y arco elevado (*pes cavus*), ponen en evidencia la enfermedad de CMT. La exploración física reveló atrofia simétrica y distal de miembros inferiores, dificultad de coordinación de movimientos, reflejos osteotendinosos y sensibilidad vibratoria en miembros superiores e inferiores ausentes.

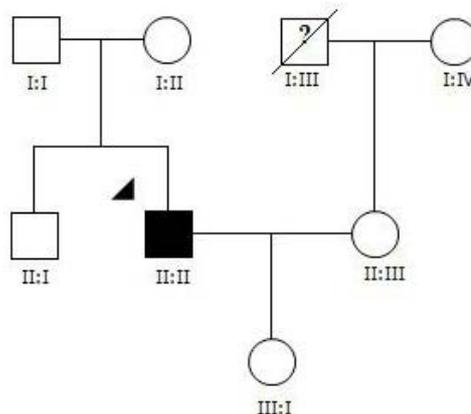


Figura 3. Árbol genealógico que representa la familia del paciente con el código 1027 (II:II).

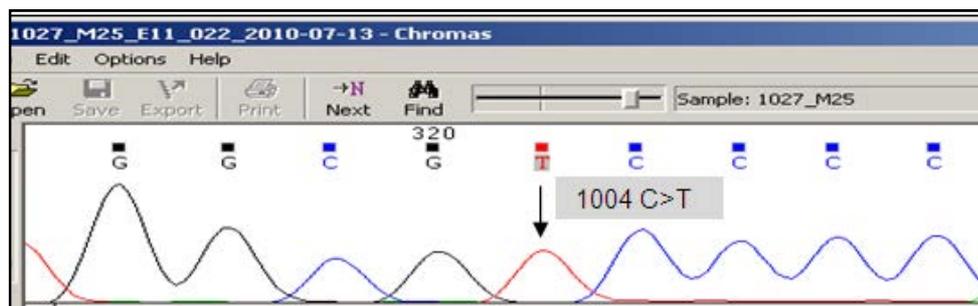


Figura 4. Secuenciación del exón 9 del gen *MED25* del paciente con el código 1027, donde se observa el cambio homocigoto 1004 C>T.

5.2. Mutaciones en el gen *MPZ*

Se encontró en 4 pacientes (dos mujeres de 54 y 68 años y dos hombres de 48 y 77 años de edad) no emparentados la mutación Tyr145Ser en el exón 3 del gen *MPZ* (434 A>C), (Fig. 15). Todos los pacientes fueron heterocigotos para la mutación (Fig. 6), la cual presenta un patrón de herencia autosómica dominante. Dos pacientes presentaron un cambio en el exón 6 del gen *MPZ* en el nucleótido 684 C>T (Ser228Ser).

Según los datos recopilados, en los 6 pacientes diagnosticados (4 pacientes detectados en este estudio y 2 pacientes ya diagnosticados que fueron incluidos para realizar una mejor correlación fenotipo-genotipo) con la mutación Tyr145Ser iniciaron con los primeros síntomas de la enfermedad en la cuarta o quinta década, exhibiendo principalmente calambres y hormigueos en los miembros inferiores y tropiezos o caídas con alta frecuencia. En cuanto a la evolución de la enfermedad los pacientes consideran que ha sido lenta en un principio, pero conforme el paso de los años la enfermedad evoluciona rápidamente.

En cuanto a la patología presente en los miembros inferiores, se reporta la presencia de disestesias, dolor, articulaciones hipomóviles, alteraciones en el equilibrio, atrofia distal, adelgazamiento en sus extremidades inferiores, *pes cavus* y por ende dificultad en la marcha. Sus miembros superiores también se han visto afectados aunque con menos severidad, ya que se ha observado presencia de disestesias y tremor, dolor, hipomovilidad y caída de objetos, pero en ninguno de ellos se ha presentado aún adelgazamiento de sus extremidades superiores.

Un total de 4 pacientes con esta mutación presentaron problemas de audición y voz ronca posiblemente por la parálisis de cuerdas vocales y tres de ellos presentaron problemas de visión. En cuanto a la evaluación de los reflejos osteotendinosos solamente un paciente tuvo normoreflexia, los otros pacientes presentaron hiporeflexia y areflexia. La sensibilidad también se vio disminuida en estos pacientes, pero principalmente la sensibilidad vibratoria fue la que presentó la mayor afectación, en miembros superiores solamente dos pacientes tuvieron sensibilidad normal pero en las extremidades inferiores ninguno de los pacientes logró percibir tal vibración. Además, en 3 pacientes se determinó un polineuropatía mixta y en dos de ellos solamente desmielinizante.

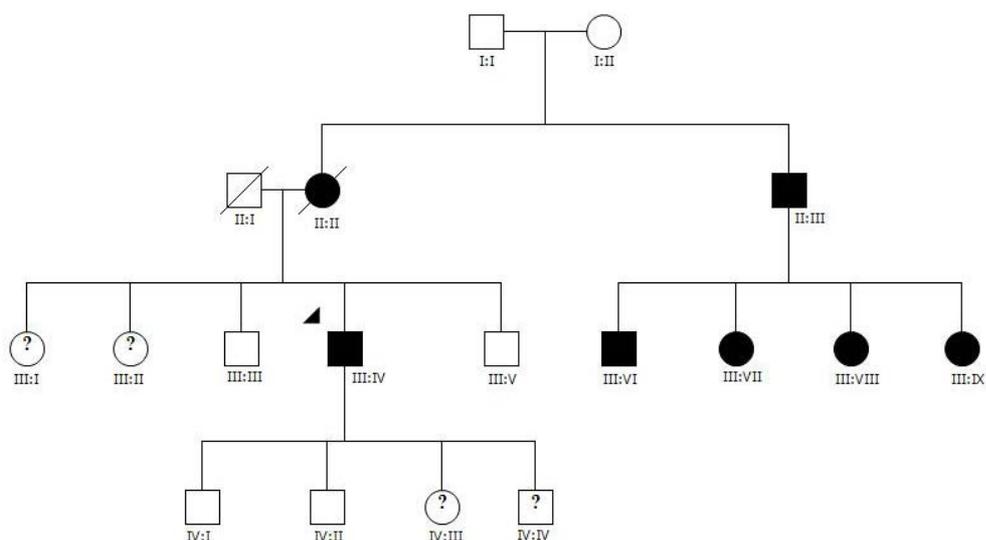


Figura 5. Árbol genealógico que representa la familia del paciente con el código 1012 (III:IV).

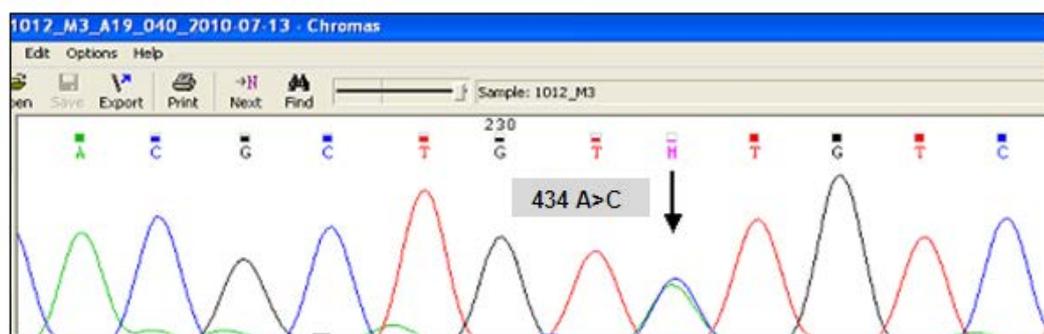


Figura 6. Secuenciación del exón 3 del gen *MPZ* del paciente con el código 1012, donde se observa el cambio heterocigoto 434 A>C.

5.3. Mutación en el gen *GJB1*

Se encontró en 6 pacientes la mutación Val13Met en el gen *GJB1* (37G>A), (Fig. 15), dos de ellos en estado heterocigota (dos pacientes femeninas de 13 y 39 años de edad) y cuatro hemocigotos (pacientes masculinos de 14, 39, 51 y 67 años de edad) (Fig.8). Todos los pacientes presentan la enfermedad de CMT, debido a que este gen es ligado al cromosoma X y presenta un tipo de herencia dominante, por lo que tanto hombres como mujeres se encuentran afectados con la neuropatía (González *et al.* 2005).

Los primeros síntomas son principalmente la debilidad en las manos, adormecimiento en los pies y caídas frecuentes, la edad de inicio no presenta un claro patrón, ya que en tres de ellos sucedió en la primera década y en los otros hasta la tercer y cuarta década, sin embargo, la evolución de la enfermedad se caracteriza por ser en todos ellos lentamente progresiva. En los pacientes con la mutación Val13Met se diagnosticó según la electromiografía una lesión mixta en cuatro de ellos y un paciente se diagnosticó con neuropatía axonal.

En general, los pacientes evidencian en sus extremidades inferiores articulaciones hipomóviles, dolor, pérdida de masa muscular, pie arco alto, atrofia simétrica distal y dificultad de marcha. Los reflejos osteotendinosos resultaron disminuidos con mayor severidad en miembros inferiores. Solamente tres pacientes presentaron disminución de la sensibilidad superficial en ambas extremidades y tres de ellos en la sensibilidad vibratoria en los pies. En miembros superiores se observó la presencia de tremor y en tres de ellos disestesias. Cabe mencionar, que la exploración física realizada a la paciente 1053 con 13 años de edad corresponde un cuadro muy leve prácticamente asintomático.

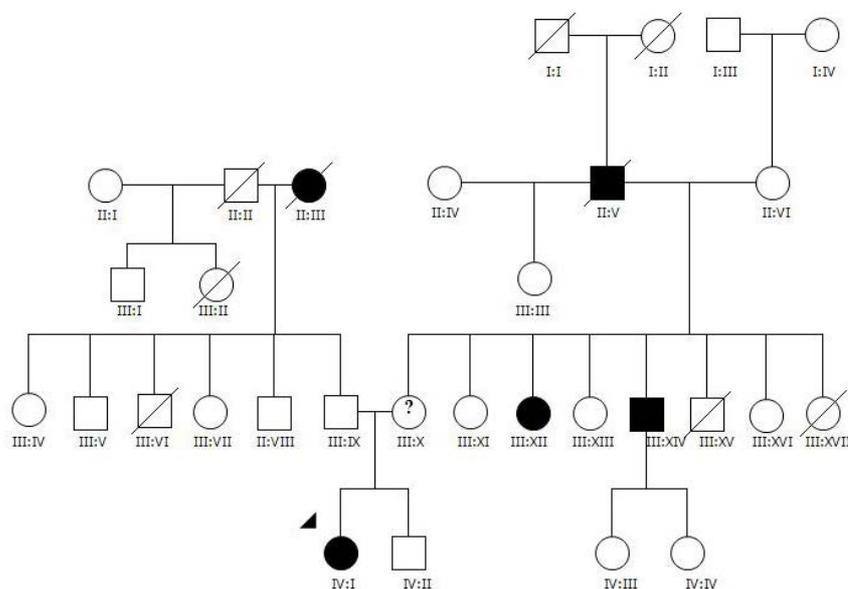


Figura 7. Árbol genealógico que representa la familia del paciente con el código 1025 (IV:I).

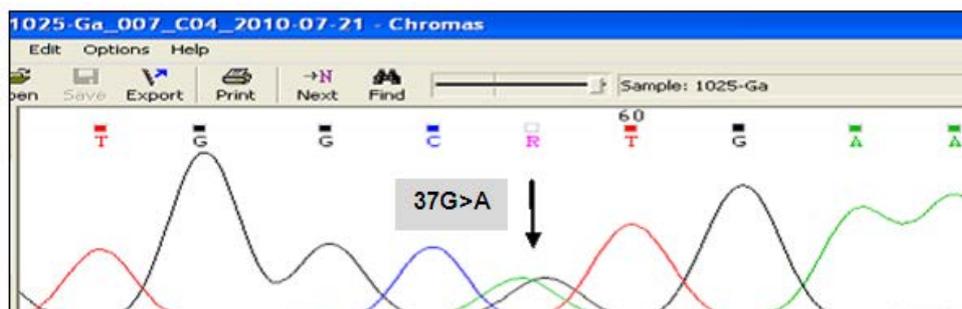


Figura 8. Secuenciación del exón2 del gen *GJB1* del paciente con el código 1025, donde se observa el cambio heterocigoto 37G>A.

5.4. Mutaciones en el gen *GDAP1*

A través de la secuenciación de las muestras de los pacientes con CMT, se encontró que 2 pacientes que reportan la mutación Gln163X (487 C>T) en estado heterocigoto y uno de ellos (IV:VIII) (Fig. 9), es heterocigoto compuesto para las mutaciones Gln163X/Ser194X (487C>T/ 581C>G) ubicadas en el exón 4 y 5 respectivamente (Fig. 10, Fig.11) (Fig. 15). Además, se encontró en 18 pacientes un cambio 507 T>G en el exón 4 del gen *GDAP1*, tanto en condición homocigota como heterocigota; así como una transversión en el nucleótido 102 G>C ubicado en el exón 1 del gen *GDAP1*, en 24 pacientes todos en estado homocigota.

Se reporta para el paciente masculino de 18 años de edad IV:VIII (Fig. 9), una edad de inicio de los síntomas al año y medio de edad, él presentaba deformidades en un pie, por lo que desde el inicio de la etapa de marcha mostraba caídas frecuentes, a la edad de 14 años empezó a utilizar silla de ruedas por dificultad al caminar. Los análisis de clínicos han reportado polineuropatía severa mixta, debido a la ausencia de respuesta eléctrica en los nervios estudiados en miembros inferiores, a pesar de utilizar estímulos de máxima intensidad durante el examen electrofisiológico.

La exploración física reveló que actualmente el paciente presenta adelgazamiento de los miembros superiores y atrofia simétrica distal, lo cual provoca la caída frecuente de objetos de sus manos. Además, presenta arco alto en sus pies, adelgazamiento de sus miembros inferiores y atrofia simétrica distal, imposibilitando por completo su marcha. La evaluación de los reflejos osteotendinosos evidencian hiporreflexia tricpital, bicipital, rotuliana y aquilileana; además, la evaluación de la sensibilidad tanto en miembros superiores como inferiores fue disminuida. En la exploración física también se determinó la presencia de escoliosis, piel laxa y voz ronca debido a la parálisis de cuerdas vocales.

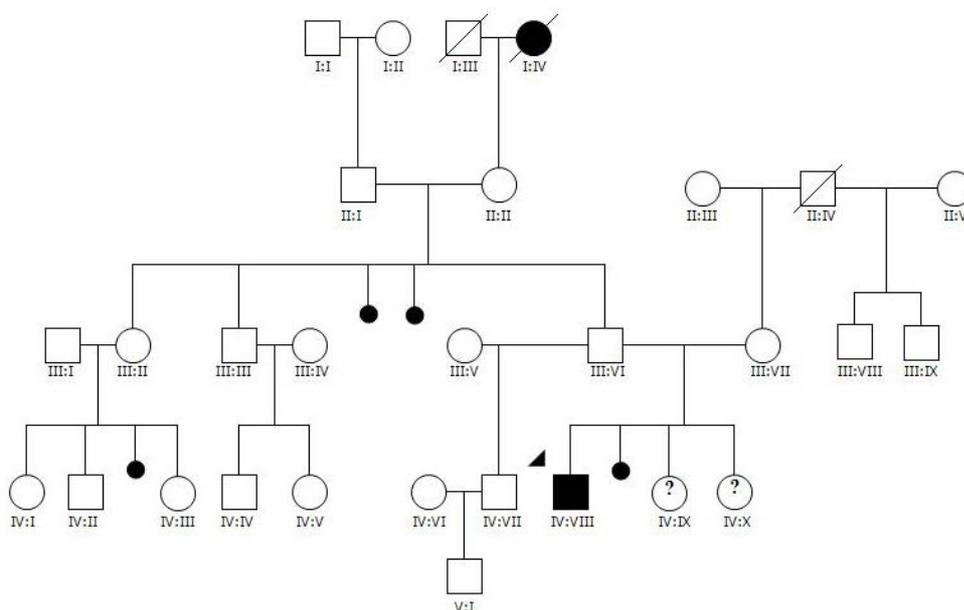


Figura 9. Árbol genealógico que representa la familia del paciente con el código 1052 (IV:VIII).

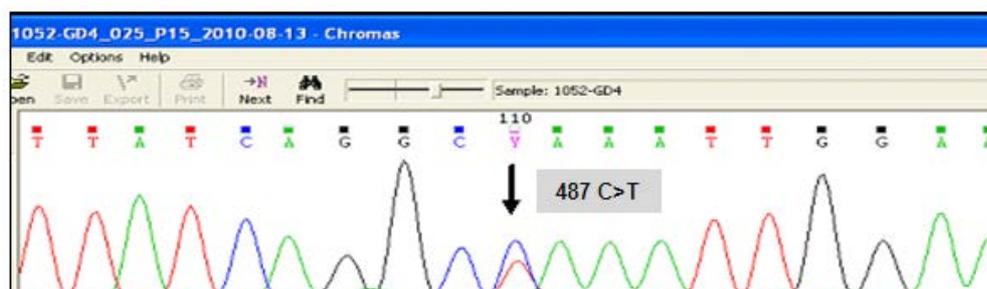


Figura 10. Secuenciación del exón4 del gen *GDAP1* del paciente con el código 1052, donde se observa el cambio heterocigoto 487 C>T.

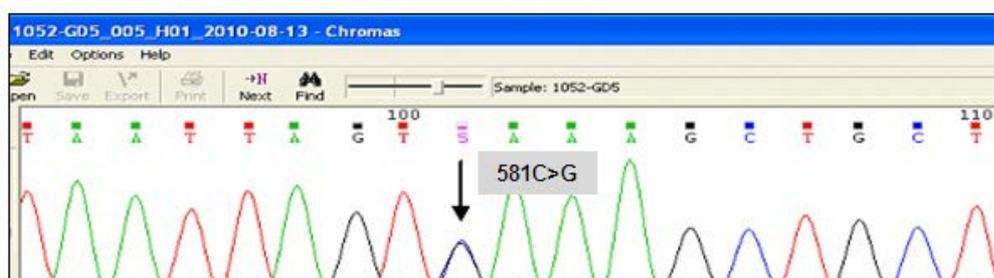


Figura 11. Secuenciación del exón5 del gen *GDAP1* del paciente con el código 1052, donde se observa el cambio heterocigoto 581C>G.

5.5. Duplicación en el gen *PMP22*

El análisis de las muestras a través de la técnica de MLPA, permitió la detección de la duplicación en el gen *PMP22* en cinco de los pacientes analizados (Fig. 13), (Fig. 15). De ellos, 4 son de sexo femenino de 11, 15, 24 y 29 años y uno es un paciente masculino de 9 años de edad.

A través de la recopilación de datos realizada en estos pacientes, se logró identificar que la edad de inicio de los síntomas se encontró dentro de la primera década de vida. En ellos se reporta múltiples tropiezos y caídas, así como marcha de puntillas en tres de ellos. Actualmente, todos los pacientes presentan en miembros inferiores articulaciones hipomóviles, arco alto y alteraciones en el equilibrio, lo cual dificulta su marcha aunque no de forma muy severa. En los estudios electrofisiológicos se encontró que 5 de ellos presentan neuropatía desmielinizante y un paciente con neuropatía mixta.

Además, se reporta en todos ellos la presencia de tremor en las manos y en general los reflejos osteotendinosos son hiporrefléxicos. La evolución de la enfermedad de CMT en estos pacientes ha sido lenta, lo cual les ha permitido desarrollarse de mejor manera en sus labores cotidianas, si se compara con pacientes de CMT con otras mutaciones más severas.

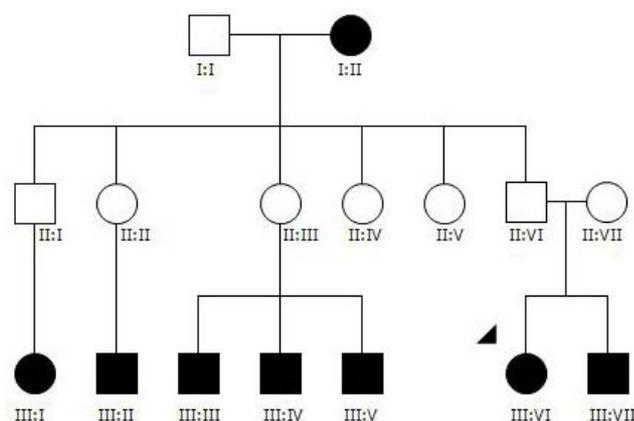


Figura 12. Árbol genealógico que representa la familia del paciente con el código 1055 (III:VI).

RESULTS P033B MLPA probemix lot 0207, 0606, 0406.txt				1055-GMsTXT.txt
				22/07/2010 14:35
				Direct analysis
				Median and Normalization Factor
				38
				21
				YES
				Unknown
				X
				0,12;21
				Too low
				Incomplete
				OK
Gene	Chr pos	Length (bp)	MV36	Ratio
Control probe 0797-L0463	05q31	130	c	Normal (0,87)
ELAC2 probe 1466-L0917	17p11.2á	346	17-012.8 ELAC2	Normal (1,02)
COX10 probe 1469-L0924	17p12-17p11.2á	418	17-014.0 COX10 Exon 07A	Gain (1,82)
COX10 probe 1468-L0925	17p12-17p11.2á	391	17-014.0 COX10 Exon 07B	Gain (2,14)
FLJ25830 probe 2729-L2156	17p12	373	17-015.1 FLJ25830 Exon 01	Gain (1,63)
PMP22 probe 4656-L4039	17p12-p11.2	142	17-015.1 PMP22 Exon 01A	Gain (1,34)
PMP22 probe 1461-L0926	17p12-p11.2	229	17-015.1 PMP22 Exon 01B	Gain (1,34)
FLJ25830 probe 2730-L2157	17p12	355	17-015.1 FLJ25830 Exon 02	Gain (1,68)
PMP22 probe 1462-L0927	17p12-p11.2	256	17-015.1 PMP22 Exon 02	Gain (1,36)
PMP22 probe 4657-L4461	17p12-p11.2	148	17-015.1 PMP22 Exon 03A	Gain (1,52)
PMP22 probe 4658-L4041	17p12-p11.2	166	17-015.1 PMP22 Exon 03B	Gain (1,5)
PMP22 probe 4655-L4463	17p12-p11.2	172	17-015.1 PMP22 Exon 04A	Gain (1,47)
PMP22 probe 2145-L1641	17p12-p11.2	310	17-015.1 PMP22 Exon 04B	Gain (1,55)
PMP22 probe 1465-L0930	17p12-p11.2	337	17-015.1 PMP22 Exon 05A	Gain (1,46)
PMP22 probe 4659-L4464	17p12-p11.2	238	17-015.1 PMP22 Exon 05B	Gain (1,73)
BX089850 probe 2678-L2158	17p12	184	17-015.2 BX089850	Gain (1,43)
TEKT3 probe 4660-L2155	17p12	292	17-015.2 TEKT3 Exon 03	Gain (1,62)
TEKT3 probe 1460-L0921	17p12	202	17-015.2 TEKT3 Exon 08	Gain (1,43)
Control probe 0960-L0547	02p12	265	c	Normal (0,98)
Control probe 0822-L0130	02p21	160	c	Gain (1,38)
Control probe 1337-L0880	07q11.23	382	c	Normal (1,02)
Control probe 1042-L0791	08q24	319	c	Normal (0,98)
Control probe 3010-L2450	09q34	283	c	Normal (1,13)
Control probe 1549-L0932	05q21	364	c	Normal (1,21)
Control probe 2958-L2390	07q31	178	c	Normal (0,96)

Figura 13. Análisis en el software Coffalyser, de los datos obtenidos de la técnica MLPA para la detección de la duplicación del gen *PMP22*, del paciente con el código 1055. Donde se observan sondas propias del gen así como sondas controles en otras regiones del genoma, para validar la prueba. Las casillas con color verde corresponden a las regiones del gen en las que se detectaron duplicaciones y las de color azul corresponden a las regiones que no se detectó la duplicación las cuales son las sondas control.

Cuadro 5. Mutaciones halladas en los pacientes con CMT y su correspondiente correlación con el resultado de la electromiografía y las características clínicas observadas. A.R: Autosómico Recesivo, A.D: Autosómico Dominante

Gen	Mutación	Herencia	Electromiografía	Características Clínicas
<i>MED25</i>	1004C>T (Ala335Val)	A. R	Axonal o Mixta	<ul style="list-style-type: none"> • Manifestaciones severas. • Edad de inicio: segunda y cuarta década. • Dificultad de marcha por severa debilidad en extremidades inferiores. • Mayor severidad en extremidades inferiores. • Déficit sensorial por vibración, posición y dolor.
<i>MPZ</i>	434A>C (Tyr145Ser)	A. D	Desmielinizante o Mixta	<ul style="list-style-type: none"> • Edad de inicio: cuarta y quinta década. • Primeras manifestaciones: Calambres, hormigueos y tropiezos. • Lenta evolución al inicio y aumenta progresivamente la evolución con el paso de los años. • Disestesia, dolor y articulaciones hipomóviles en extremidades inferiores y superiores. • Poca sensibilidad vibratoria, disminución del equilibrio y dificultad de marcha. • Caída frecuente de objetos

				<p>de las manos.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Reflejos osteotendinosos con hiporreflexia o arreflexia. • Problemas de audición, visión y voz ronca.
<i>GJB1</i>	37G>A (Val13Met)	Ligada al X	Axonal o Mixta	<ul style="list-style-type: none"> • Manifestaciones clínicas severas. • Evolución rápidamente progresiva. • Edad de inicio: primera década. • Piel laxa y voz ronca. • Primeras manifestaciones: deformidades de pies y dificultad de marcha. • Ortesis y silla de ruedas alrededor de la segunda década. • Atrofia simétrica distal, <i>pes cavus</i>, dedos de martillo adelgazamiento de extremidades. • Reflejos osteotendinosos: hiporreflexia y sensibilidad disminuida.
<i>GDAP1</i>	487C>T (Q163X)	A. R	Mixta o Axonal	<ul style="list-style-type: none"> • Manifestaciones clínicas severas. • Evolución rápidamente progresiva. • Edad de inicio: primera década. • Piel laxa y voz ronca. • Primeras manifestaciones:

	5841C>G (S194X)			<p>deformidades de pies y dificultad de marcha.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ortesis y silla de ruedas alrededor de la segunda década. • Atrofia simétrica distal, <i>pes cavus</i>, dedos de martillo adelgazamiento de extremidades. • Reflejos osteotendinosos: hiporreflexia y sensibilidad disminuida.
<i>PMP22</i>	Duplicación 1,5Mb	A. D.	Desmielinizante	<ul style="list-style-type: none"> • Manifestaciones poco severas y de lenta progresión. • Edad de inicio: primera o segunda década. • Primeras manifestaciones: Tropezos y marcha en puntillas. • Adelgazamiento de extremidades inferiores y <i>pes cavus</i> poco perceptible o ausente. • Articulaciones hipomóviles en miembros inferiores. • Reflejos osteotendinosos: hiporreflexia o arreflexia. • Presencia de tremor en miembros superiores

5.6. Análisis Estadísticos

5.6.1. Genes involucrados con el desarrollo de CMT que se han detectado en Costa Rica

Según la recopilación de los datos obtenidos en los estudios realizados en Costa Rica sobre la enfermedad de CMT, se han determinado 7 diferentes mutaciones en los 5 genes evaluados en 20 familias analizadas hasta el momento, en las cuales se han detectado en algunas de estas familias alrededor de 60 individuos con la mutación (Com. Pers. Alejandro Leal).

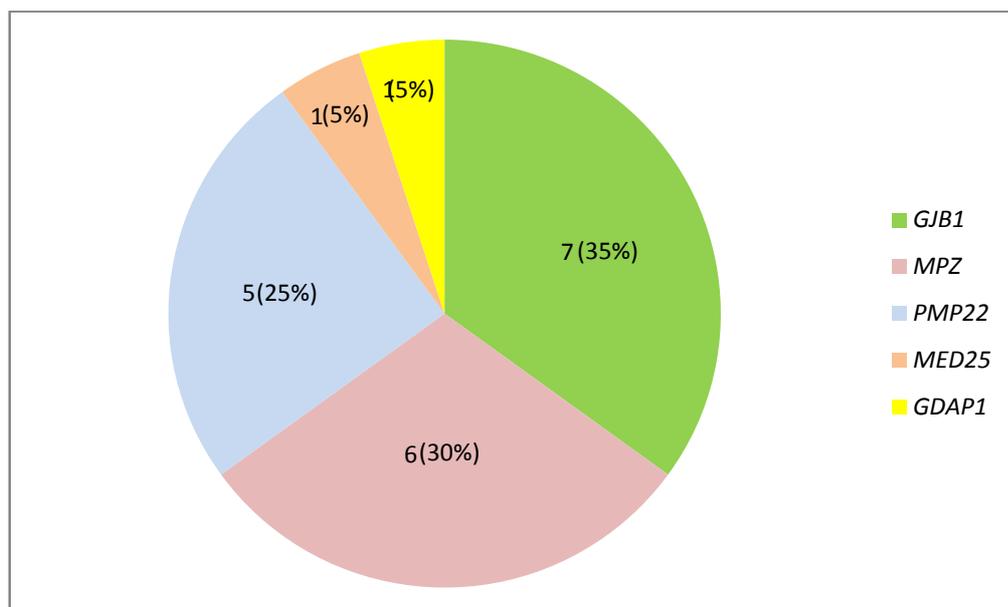


Figura 14. Totalidad de mutaciones detectadas en los genes *MPZ*, *MED25*, *GJB1*, *GDAP1* y *PMP22*, en familias costarricenses con CMT, a través de los todos los estudios realizados en nuestro país.

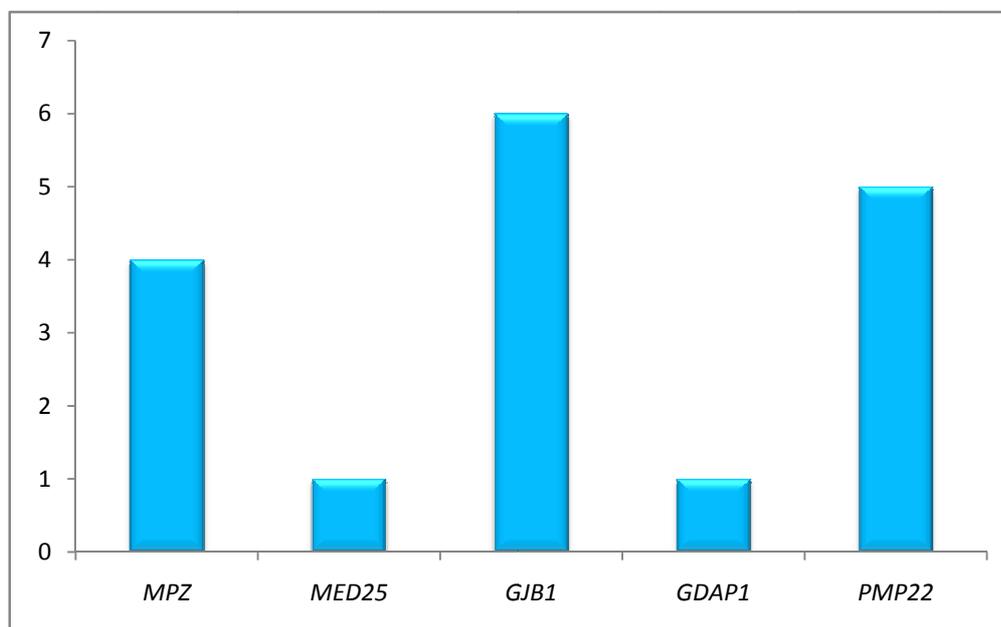


Figura 15. Número de pacientes con mutaciones causantes de CMT, detectadas en los genes *MPZ*, *MED25*, *GJB1*, *GDAP1* y *PMP22*, halladas en este estudio.

5.6.2. Análisis de Coordenadas Principales

Se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) que consiste en la representación de datos a través de la construcción de una configuración de puntos cuando se conoce una determinada información sobre proximidades entre objetos, este método de análisis en el presente estudio se realizó utilizando matrices mixtas, mediante los índices de similitud de Gower para variables multiestado, índice de Bray-Curtis para datos mixtos como lo es la edad e índice de Dice para las variables de presencia-ausencia, con el fin de unificar los valores de las variables para incorporarlas en las ecuaciones de cada eje (Hammer *et al.* 2001).

El análisis de coordenadas principales de variables y pacientes, nos permite de manera más precisa, identificar las variables que se encuentran más relacionadas en un paciente y por ende con el gen evaluado; así por ejemplo podemos apreciar que las variables que se encuentran hacia los valores positivos del gráfico presentan mayor presencia en pacientes con la mutación en el gen *MPZ* y que las variables ubicadas hacia los valores negativos son más frecuentes en pacientes con mutaciones en *PMP22* o *GJB1*(Fig. 16).

A través de la figura 17 que retoma el gráfico anterior (Fig. 16), se puede determinar con mayor claridad la relación entre y dentro de cada grupo; se logró determinar que la sintomatología presente en los pacientes con la mutación en el gen *MPZ* presentó una tendencia a diferir con la identificada en los genes *PMP22* y *GJB1*, mientras que en estos dos genes se observa un traslape entre los síntomas. Así mismo, se puede observar que el fenotipo entre los pacientes con la mutación en *MPZ* son los que presentan mayor variabilidad, mientras que los pacientes con la duplicación en *PMP22* son los que presentan una sintomatología más uniforme, seguido de los pacientes con la mutación en *GJB1*. Las características clínicas del paciente 1052 se asemejan a las presentadas por los pacientes con *MPZ*, por su parte, el paciente 1027 se comporta como los que presentan mutaciones en *GJB1* y *PMP22*.

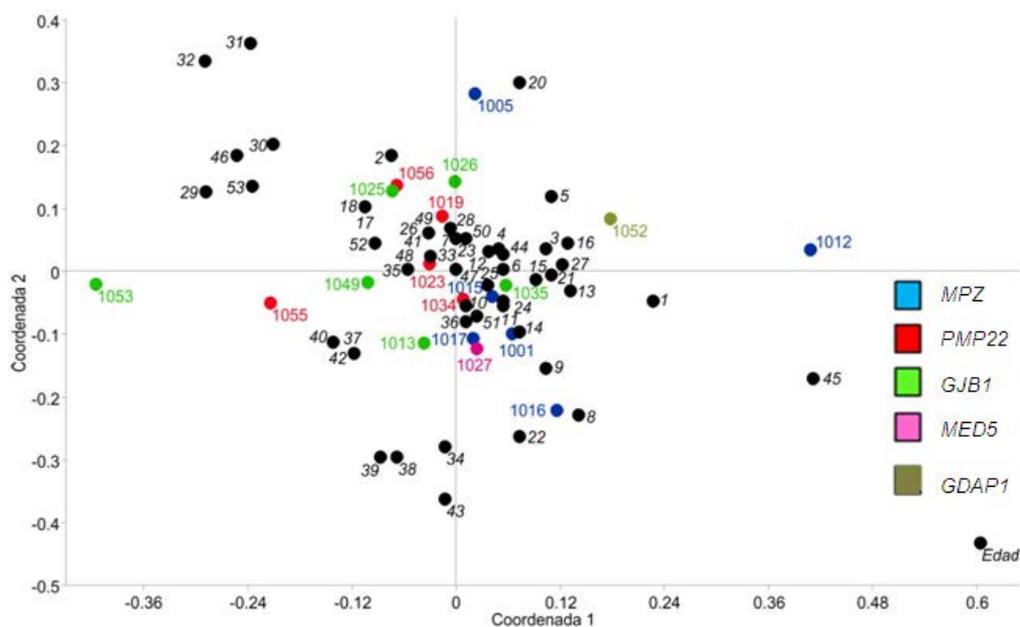


Figura 16. Análisis de coordenadas principales utilizando 57 variables (cuantitativas, ordinales y de presencia-ausencia) para mostrar la similitud fenotípica de los pacientes con mutaciones en los genes *MPZ*, *PMP22*, *GJB1*, *MED25* y *GDAP1*. Se presentan también los vectores de las variables empleadas.

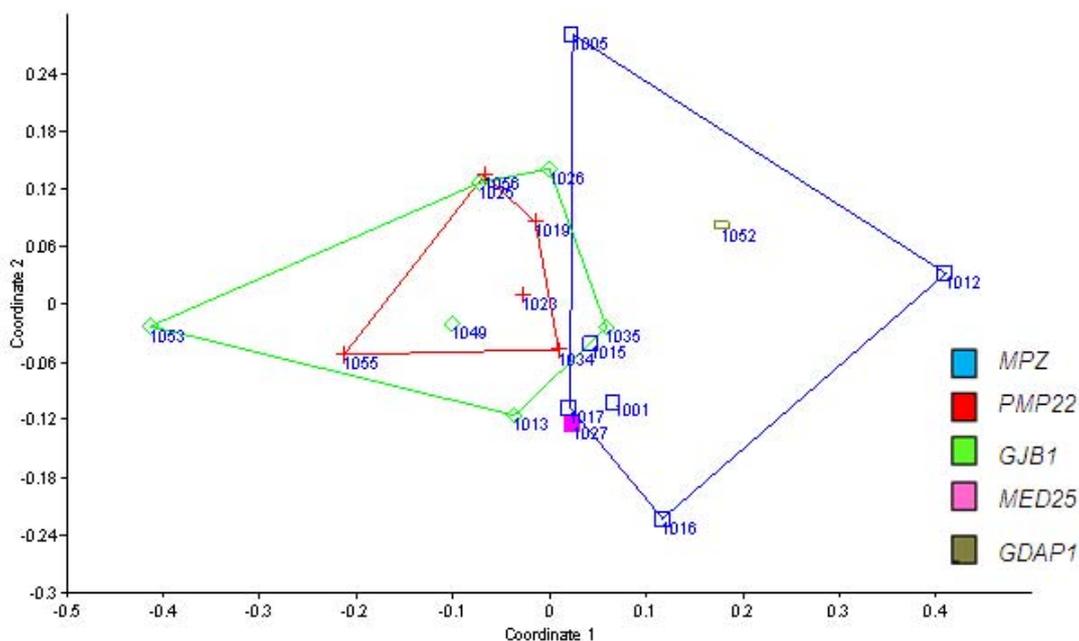


Figura 17. Similitud de la sintomatología de cada paciente según la mutación detectada a través del método de análisis de Coordenadas Principales.

5.6.3. Análisis de Similitudes (ANOSIM)

El resultado del análisis de similitudes ANOSIM, evidenció una diferencia significativa entre los síntomas de los pacientes entre las mutaciones analizadas $p=0.028$, pero de apenas un 19.6%. Esto con un alfa de 0.05% (95% de confianza). Según los resultados de este análisis, tanto con el análisis de “p” como de “R”, se puede determinar que existe una diferencia de los síntomas identificados en los pacientes con la duplicación del gen *PMP22* y *MPZ* de un 19% ($0.10 > p > 0.05$) y una diferencia de 27% ($p < 0.05$) de los síntomas presentes en pacientes con la mutación en el gen *MPZ* y *GJB1* (Cuadro 6 y 7).

Cuadro 6. Valores “p” del ANOSIM para cada comparación entre los síntomas de los pacientes de cada mutación.

P	PMP22	MPZ	GJB1	MED25
PMP22				
MPZ	0.056			
GJB1	0.770	0.016		
MED25	0.667	0.714	0.566	
GDPA1	0.164	0.284	0.137	1.000

Cuadro 7. Valores de “R” del ANOSIM para cada comparación entre los síntomas de los pacientes de cada mutación. Los valores negativos de R se pueden interpretar como ausencia de diferencia.

R	PMP22	MPZ	GJB1	MED25
PMP22				
MPZ	0.19			
GJB1	-0.10	0.27		
MED25	-0.04	-0.22	-0.02	
GDPA1	1.00	0.56	0.78	2.00

6. DISCUSIÓN

En Costa Rica se han realizado estudios relacionados con CMT desde finales de los años 90's, en los cuales a través de diversas metodologías de análisis de ligamiento, identificación de mutaciones así como pruebas funcionales, se ha logrado identificar la presencia de mutaciones en algunos de los genes causantes de CMT reportados en otras poblaciones, así como mutaciones no reportadas anteriormente en el mundo.

El gen *GDAP1* no había sido evaluado en los pacientes costarricenses con CMT, en el cual se diagnosticó un paciente; por su parte la duplicación en el gen *PMP22* no había sido encontrada anteriormente, por lo que los porcentajes mostrados en la figura 14 solamente pertenecen a este estudio.

En el gen *MPZ* ya se habían reportado las mutaciones Tyr145Ser y Thr124Met en los estudios anteriores, y en esta investigación solamente la mutación Tyr145Ser fue encontrada (Leal 2004). Anteriormente se había reportado la mutación Ala335Val en el gen *MED25* (Leal *et al.* 2001), la cual fue hallada nuevamente en un paciente en esta investigación, perteneciente a la misma familia. En cuanto al gen *GJB1*, anteriormente se detectó en una familia la mutación Glu186Lys (Com. Pers. Alejandro Leal), la cual no fue hallada en este estudio, solamente se detectó el cambio Val13Met en dicho gen. La Figura 14 muestra una recopilación de los datos obtenidos en los estudios anteriores y el actual, el cual representa el número de familias en las cuales se ha encontrado mutación causante de CMT, cabe mencionar que en algunas de estas familias, se ha realizado el análisis molecular a más individuos con la enfermedad, y se han detectado en algunas familias alrededor de 60 individuos con la mutación (Com. Pers. Alejandro Leal).

Un estudio realizado en el 2006 por Song y colaboradores, así como la reciente recopilación de datos realizada por Braathen y colaboradores (2011), muestran que en países asiáticos, europeos y Estados Unidos la duplicación de

1.5 Mb del gen *PMP22*, se encuentra presente en un alto porcentaje de los pacientes diagnosticados con CMT, seguido de mutaciones en los genes *GJB1* y *MPZ* respectivamente (Fig. 18, Fig.19), por el contrario, los datos que se han recopilado para nuestro país, muestran a los mismos 3 genes como los más frecuentes pero en nuestro país el gen *GJB1* se encuentra en mayor porcentaje, seguido por *MPZ* y *PMP22* en tercer lugar (Fig. 14).

The distribution of mutations in CMT1 patients									
Ethnic group	<i>CMT1A</i> - duplication	Non-duplicated cases					Uninformative	Total	References
		<i>PMP22</i>	<i>MPZ</i>	<i>Cx32</i>	<i>EGR2</i>	<i>LITAF</i>			
Asians									
China	20 (62.5%)	0	1 (3.1%)	2 (6.3%)	0	0	9 (28.1%)	32	This study
Korea	15 (53.6%)	1 (3.6%)	1 (3.6%)	2 (7.1%)	1 (3.6%)	—	7 (25.0%)	28	Choi et al. ¹⁵
Japan	40 (31.3%)	6 (4.7%)	12 (9.4%)	14 (10.9%)	—	—	56 (43.8%)	128	Numakara et al. ¹⁷
Europeans									
Italy	98 (57.6%)	2 (1.2%)	4 (2.4%)	12 (7.1%)	—	—	54 (31.8%)	170	Mostacciolo et al. ¹⁸
Russia	58 (53.7%)	2 (1.9%)	5 (4.6%)	8 (7.4%)	—	—	32 (29.6%)	108	Mersyanova et al. ¹⁹
Europe	579 (70.7%)	—	—	—	—	—	—	819	Nelis et al. ²⁰
Spain	86 (64.7%)	—	—	—	—	—	—	133	Bort et al. ²¹
USA	79 (56.4%)	3 (2.1%)	5 (3.6%)	8 (5.7%)	1 (0.7%)	—	44 (31.4%)	140	Boerkoel et al. ²²
	43 (68.3%)	—	—	—	—	—	—	63	Wise et al. ²³
Global	79 (73.8%)	3 (2.8%)	5 (4.7%)	8 (7.5%)	1 (0.9%)	—	11 (10.3%)	107	Szigeti et al. ⁹

Figura 18. Distribución de mutaciones en países asiáticos, europeos y USA en pacientes con CMT1 (Song et al. 2006).

Country/Continent	No. of		PMP22	Mutations								
	Families (N)	Patients (N)	Duplication % (n)	PMP 22% (n)	Cx 32% (n)	MPZ % (n)	EGR2 % (n)	MFN2 % (n)	SIMPLE % (n)	NEFL % (n)	PRX % (n)	MTMR2 % (n)
General population												
This study	81	189	13.6 (11)	0.0 (0)	6.2 (5)	1.2 (1)	0.0 (0)	6.2 (5)	0 (0)	-	-	-
Clinic populations												
American [19]	75	75	57.3 (43)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
American [20]	152	152	52.0 (79)	3.3 (5)	7.2 (11)	3.3 (5)	0.7 (1)	-	-	0.7 (1)	0.7 (1)	0 (0)
Finland [16]	122	330	52.5 (64)	0.8 (1)	9.8 (12)	2.5 (3)	-	-	-	-	-	-
France [21]	14	30	40.0 (12)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Japan [22]	11	19	26.3 (5)	-	-	57.9 (11)	-	-	-	-	-	-
Japan [23,24]	124	124	-	-	-	-	-	-	-	2.4 (3) ^a	-	-
Japan [25]	-	217	25.8 (56)	1.8 (4)	4.1 (9)	3.7 (8)	-	-	-	-	-	-
Korea [17]	57	238	26.3 (15)	1.8 (1)	5.3 (3)	5.3 (3)	1.8 (1)	-	-	3.5 (2)	-	-
Russia [26]	174	174	33.9 (59)	1.1 (2)	8.6 (15)	3.4 (6)	-	-	-	-	-	-
Spain [27,28]	133	133	64.7 (86)	0.8 (1)	7.5 (10)	3.8 (5)	-	-	-	-	-	-
Sweden [15]	29	67	31.0(9)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
The Netherlands and Germany [29]	-	396	27.5 (109)	3.0 (12)	6.0 (24)	0.7 (3)	-	-	-	-	-	-

MFN2, mitofusin2; SIMPLE, small integral membrane protein of lysosome/late endosome.

^aFive of eight mutations were polymorphisms.

Figura 19: Prevalencia de CMT en países industrializados (Braathen *et al.* 2011).

6.1. Gen *MED25*

En estudios anteriores realizados por Leal y colaboradores (2009), se ha demostrado que no hay diferencia en cuanto a la clínica de un individuo homocigoto silvestre a uno heterocigoto para el cambio Ala335Val, por lo que la mutación hallada en los dos pacientes en estado heterocigoto, no explican la presencia de la enfermedad de CMT, será necesario continuar la búsqueda en otras regiones, para determinar la causa genética de la enfermedad en ambos pacientes.

Solamente en un paciente fue hallado la mutación Ala335Val en estado homocigoto, el cual es residente de Palmares y es perteneciente a la misma familia en la que se descubrió en primera instancia el locus19q13.3 ligado a la enfermedad y posteriormente la mutación en el gen *MED25* como responsable del CMT en esa familia (Berghoff *et al.* 2004, Leal *et al.* 2009). Por lo que esta

mutación sigue considerándose como una variante rara, ya que hasta hoy individuos homocigotos recesivos no se ha reportado en ninguna otra familia en el país ni en la población del mundo, solamente se han encontrado portadores (heterocigotas) en Costa Rica y uno en Alemania (Leal *et al.* 2009, Rojas *et al.* 2009).

La edad en que se reporta el inicio de los síntomas del paciente 1027, la severa debilidad en las extremidades inferiores y por ende la dificultad de marcha y la afectación en miembros superiores en menor medida que en las extremidades inferiores, corresponde con la reportada en los estudios anteriores. Además, los pacientes homocigotos reportados anteriormente presentaron déficit sensorial por vibración, posición y dolor; mientras que el paciente evaluado recientemente solamente presentó déficit sensorial vibratorio en miembros superiores e inferiores (Berghoff *et al.* 2004, Leal *et al.* 2009).

A pesar de que en este estudio solamente se encontró un paciente con la mutación Ala335Val, el reporte de los hallazgos fenotípicos de los otros pacientes reportados con la misma mutación, permiten realizar una recopilación de información valiosa para el establecimiento de una estrategia de búsqueda de genes de CMT en nuestro país.

Cabe mencionar, que el probando reportado con esta mutación, ha sido diagnosticado con diabetes, por lo que cabe la posibilidad que la severidad de la neuropatía que él presenta se vea afectada por esta enfermedad, lo cual podría afectar los datos recopilados a través de la exploración física, aunque actualmente se encuentra controlada en el paciente. En el caso de los resultados electrofisiológicos podría afectar la condición diabética del paciente, ya que se determinó una neuropatía mixta con predominancia axonal y no CMT axonal como es característico de la mutación Ala335Val según los pacientes costarricenses diagnosticados anteriormente (Berghoff *et al.* 2004).

A través de análisis funcionales, se demostró que la proteína mutante disminuye su capacidad de activación SH3 específica, y puede reconocer a otros dominios SH3 que anteriormente no podía, afectando la activación de los genes blanco de la proteína (Leal *et al.* 2009). Esta importante función de MED25 en el SNP parece comprometer el adecuado funcionamiento de muchas proteínas necesarias para el adecuado funcionamiento de las neuronas periféricas, lo cual podría explicar que los pacientes de CMT con la mutación Ala335Val presentan un fenotipo severo.

6.2. Gen MPZ

En el estudio de Leal y colaboradores (2003) y posteriormente en el de Starr y colaboradores (2003), se demostró que la mutación sin sentido Tyr145Ser es una de las mutaciones causantes de CMT. Esta mutación fue detectada en pacientes con la enfermedad de CMT y posteriormente en los análisis realizados en individuos controles relacionados y no relacionados, la transversión no estuvo presente.

Los pacientes con la mutación Tyr145Ser de la familia evaluada en Costa Rica reportan el inicio de los síntomas alrededor de la cuarta década, además de un déficit sensorial en ambas extremidades, pero principalmente se observó que la sensibilidad vibratoria fue muy disminuida y sobre todo en miembros inferiores; estos datos son concordantes con la información de la exploración física realizada en este estudio (Leal *et al.* 2002).

Sin embargo, cinco de los pacientes evaluados en ese estudio presentaron atrofia distal de miembros inferiores, cuatro de ellos tenían disminución en la capacidad de audición y tres presentaron problemas de visión a pesar de ser heterocigotos para la mutación Tyr145Ser, presentando el mismo fenotipo que se encontró exclusivamente en los pacientes homocigotos reportados anteriormente (Leal *et al.* 2002).

La sordera ha sido parte del fenotipo encontrado en múltiples ocasiones en pacientes con CMT, al realizar la exploración genética en los individuos, se ha determinado que algunos pacientes con mutaciones en *PMP22* y *GJB1* pueden presentar problemas de audición, asimismo se asocia con formas recesivas de la enfermedad, tal es el caso del paciente heterocigoto compuesto para *GDAP1* de este estudio. En pacientes con mutaciones en el gen *MPZ* de igual forma se ha reportado que padecen de problemas de audición; tal es el caso de cuatro de los pacientes con la mutación Tyr145Ser reportados en esta investigación (Starr *et al.* 2002).

Estudios realizados anteriormente en probandos diagnosticados por CMT, problemas de audición y con la misma mutación (Tyr145Ser), sugieren que esta patología podría deberse a una desincronización por desmielinización de las fibras nerviosas auditivas, o a una reducción neural debido a la pérdida axonal o mal acoplamiento entre las células internas ciliadas y las dendritas del nervio auditivo (Starr *et al.* 2002).

El cambio en el exón 6 684C/T (Ser228Ser) encontrado en dos pacientes, ha sido reportado anteriormente como un polimorfismo, ya que además se determinó en un estudio anterior con 60 controles, que esta mutación silenciosa no segrega con la enfermedad, además porque el cambio nucleotídico genera la incorporación de un mismo aminoácido (Nelis *et al.* 1994, Mersiyanova *et al.* 2000).

En el estudio realizado por Starr y colaboradores (2003), se identificó en pacientes con la mutación Tyr145Ser un patrón degenerativo consistente con el de CMT2; en el estudio de Leal y colaboradores (2003) además de coincidir con este tipo de neuropatía se encontró que algunos pacientes también presentaban un patrón desmielinizante. En el presente estudio se determinaron neuropatías tanto desmielinizantes como mixtas, lo cual indica que los pacientes con esta mutación

podrían exhibir los tres tipos de neuropatía, pero principalmente se observa desmielinización.

6.3. Gen *GJB1*

Muchas mutaciones que se han encontrado en el gen *GJB1* comprometen la funcionalidad de las células de Schwann y por consiguiente la adecuada conducción nerviosa a través de los nervios periféricos. A pesar de que la proteína CX32 participa en procesos de compactación de mielina, se ha encontrado que pacientes con CMTX pueden presentar más daño axonal que desmielinizante (Bone *et al.* 1997). Otros hallazgos también sugieren que pacientes CMT1X presentan degeneración principalmente axonal (Vavlitou *et al.* 2010). En los pacientes evaluados en este estudio se logra evidenciar que la mutación Val13Met, puede ocasionar tanto daño a nivel de mielina como en el axón de la neurona periférica, al determinarse daño axonal y mixto en los resultados de las electromiografías.

Las investigaciones realizadas en modelos de ratones *GJB1* revelan que la proteína GJB1 media interacciones entre el axón y las células de Schwann, pero que el daño que sufren los axones es más rápido e importante que el daño producto de la desmielinización de las neuronas y además la patología axonal precede a la desmielinizante, lo cual explica que los pacientes analizados en este estudio hayan sido clasificados como CMT intermedio (Vavlitou *et al.* 2010).

Las mutaciones en el gen *GJB1* son heredadas con un patrón ligado al X dominante, por lo que se menciona en el estudio de González y colaboradores (2005) que la severidad en los hombres es mayor y desde la primera década, por el contrario, las mujeres suelen presentar un inicio tardío y menos severo. En contraste, en este estudio no se pudo determinar una diferencia entre hombres y mujeres afectados, en cuanto a la severidad y la edad de inicio de la enfermedad.

6.4. Gen *GDPA1*

En general, las mutaciones en el gen *GDPA1* se caracterizan por la temprana edad de inicio de los síntomas y una consecuente severidad progresiva de la enfermedad (Cassereau *et al.* 2011, Nelis *et al.* 2002). Así mismo, a pesar de que solamente se logró detectar un paciente con mutaciones en el gen *GDPA1*, los datos suministrados por la literatura que describen las características clínicas de los pacientes con alguna de las mutaciones encontradas en el paciente 1052, relatan un cuadro clínico semejante, de herencia autosómica recesiva.

Tanto la transición 487C>T como la transversión 581C>G, provocan mutaciones sin sentido Q163X/S194X respectivamente, formando durante la traducción proteínas truncadas que no pueden realizar su función en la red mitocondrial. La ausencia de esta proteína en los pacientes con este tipo de mutaciones sin sentido, podría explicar la severidad del fenotipo que ellos presentan (González 2005). En el meta-análisis realizado por Cassereau *et al.* (2011) se constató que todos los pacientes que portan mutaciones causantes de la producción de proteínas truncadas requieren de ortesis y posteriormente de silla de ruedas antes de la tercera década.

En algunas ocasiones el diagnóstico realizado en pacientes que portan mutaciones en el gen *GDPA1*, ha sido clasificado como axonal y en otros como desmielinizante. En otras ocasiones, en un mismo paciente se han detectado ambos tipos de neuropatía, por lo que no se ha podido establecer una correlación clara entre el tipo de CMT y las mutaciones presentes en un paciente (Cuesta *et al.* 2002, Nelis *et al.* 2002). Lo anteriormente evidenciado en otros estudios es concordante con la información clínica mencionada sobre el paciente 1052, ya que se ha determinado que presenta neuropatía mixta (tanto axonal como desmielinizante).

Se ha visto que las formas recesivas de CMT están asociadas con la parálisis de cuerdas vocales. Este signo suele aparecer comúnmente en la

segunda década en el 80% de los pacientes que portan una mutación truncada y particularmente un 40% de estas veces se asocia con la mutación Q163X (Cassereau *et al.* 2011). En los pacientes de origen marroquí que fueron homocigotos para la mutación S194X no se detectó parálisis de cuerdas vocales, pero, en los homocigotos para Q163X o heterocigotos compuestos portando esta mutación, descritos por Boerkoel *et al.*(2003), Cuesta *et al.*(2002) y el paciente del presente estudio, presentaron un cambio en la voz debido a la parálisis de cuerdas por lo que este caso contribuye a aumentar la evidencia de correlación entre la parálisis de cuerdas vocales y la mutación Q163X.

Los datos proporcionados por Bouhouche *et al.* (2007) describen las características fenotípicas de pacientes homocigotos para la mutación S194X. Estas descripciones corresponden a pacientes de origen marroquí que exhibían fenotipos severos, los cuales en su mayoría concuerdan con las descritas para el paciente 1052 del presente estudio.

Solamente en el trabajo de Cuesta y colaboradores (2002) se ha encontrado una familia con el mismo genotipo del paciente 1052, la caracterización clínica de ellos es realizado por Sevilla y colaboradores (2003). Entre otros datos se reporta que ellos fueron capaces de caminar normalmente aunque con caídas frecuentes y debilidad en las manos, pero en la segunda década inició la parálisis de cuerdas y empezaron a utilizar la silla de ruedas. Se reportó atrofia distal de miembros superiores, deformidades a nivel de médula espinal, *pes cavus*, dedos de martillo en las manos y todos los tipos sensibilidad registrados fueron disminuidos. Esta descripción corresponde con exactitud con la descrita por el paciente costarricense de este estudio.

Se ha postulado que la mutación Q163X presente en el gen *GDAP1* tuvo su aparición hace 33000, es la mutación con mayor prevalencia en España y también sido encontrada en tres familias Hispánicas en Norteamericana no emparentadas pero con el mismo haplotipo. Cabe mencionar que dos de las familias en que se

detectó esta mutación son de origen costarricense (Boerkoel *et al.* 2003). Según análisis de haplotipos realizados por Claramunt y colaboradores (2005) la mutación tiene origen en la Península Ibérica. Por su parte, la mutación S194X ha sido reportada en África del Norte y España, y según los análisis de haplotipos existe un efecto fundador en la población marroquí y en la española (Nelis *et al.* 2002).

El paciente 1052 fue diagnosticado a los 10 años de edad con neuropatía axonal y cinco años más tarde el resultado determinó polineuropatía mixta, evidenciando así la progresión degenerativa del paciente. En los pacientes reportados por Sevilla y colaboradores (2003) con la mutación Q163X los pacientes presentaron pérdida axonal, mientras que los del estudio de Boerkoel y colaboradores (2003) mostraron una neuropatía mixta. El mismo panorama se presenta en pacientes con la mutación S194X, lo cual sugiere que la enfermedad inicia con daños axonales y con el tiempo puede afectar la mielinización de las neuronas periféricas, presentando un cuadro mixto (Nelis *et al.* 2002).

En este mismo *locus*, el cambio 507 T>G provoca una mutación silenciosa (Ser169Ser), se ha encontrado tanto en pacientes con CMT como en individuos controles (Claramunt *et al.* 2005, Senderek *et al.* 2003), por lo que se ha determinado que el cambio no se encuentra relacionado con el fenotipo de CMT. Por su parte, el cambio 102 G>C que también produce una mutación silenciosa (Ser34Ser), fue encontrada en el probando de una familia de Turquía, que además presentaba una mutación con sentido en estado homocigoto, por lo que se cree que este cambio corresponde solamente a un polimorfismo y no a una mutación (Sahin *et al.* 2009).

6.5. Duplicación del gen *PMP22*

La duplicación del gen *PMP22* se ha reportado como la causa más común de CMT a nivel mundial (Kwon *et al.* 2009). En nuestro país, esta mutación no había sido identificada en ningún paciente con diagnóstico de CMT. Los recientes

hallazgos evidencian la presencia de la duplicación en Costa Rica, pero solamente representa un 20.8% del total de las mutaciones encontradas (Fig.15); un estudio con un mayor número de muestra sería necesario para confirmar nuestra observación de que la duplicación del gen *PMP22* no es la mutación causante de CMT más frecuente en Costa Rica.

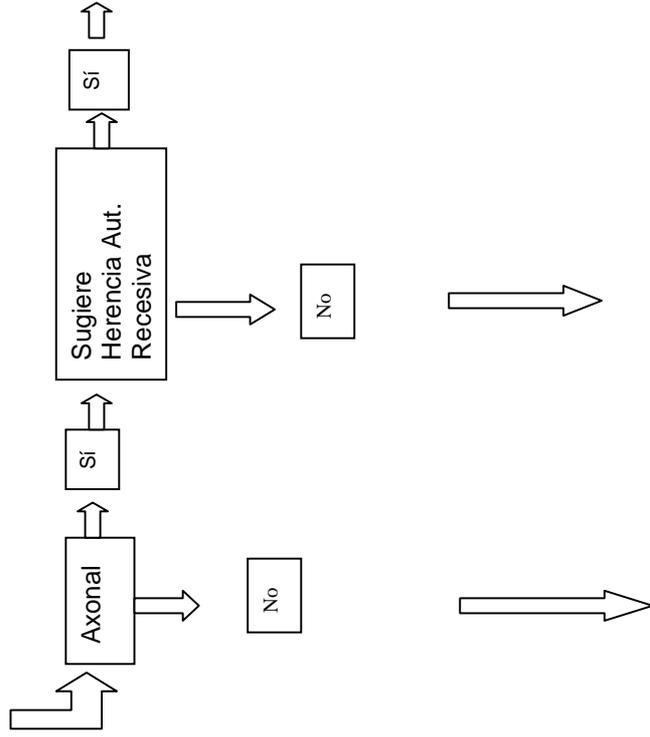
Se ha estimado que el inicio de los síntomas de CMT originado por la duplicación en el gen *PMP22* es de edad temprana, ya sea en la primera o segunda década de vida (Keckarevic *et al.* 2009). Estudios como los realizados por Nicolaou *et al.* (2010) reportan el inicio de los síntomas en la segunda década (12-15 años), mientras que los pacientes analizados por Keckarevic *et al.* (2009) presentan un inicio en la primera y segunda década, y los pacientes reportados en este estudio (1019, 1023, 1034, 1055 y 1056) inician con síntomas de CMT en la primera década de vida.

En el estudio de Arenas y colaboradores (2008) evaluaron las características clínicas de pacientes con la duplicación de *PMP22*, y observaron leve adelgazamiento en miembros inferiores y *pes cavus* apenas perceptible así como poca sensibilidad, al igual que en nuestros pacientes. Los resultados en cuanto a la evaluación de los reflejos osteotendinosos son hiporeflexia en contraste con lo hallado por Arenas y colaboradores (2008) y Keckarevic y colaboradores (2009) donde se presenta total pérdida de reflejos. Otro aspecto a evaluar es la presencia de tremor, ya que todos los pacientes en este estudio lo presentaron, mientras que en el estudio con 36 pacientes de Keckarevic y colaboradores (2009) pocos pacientes mostraron tremor.

Los análisis en pacientes con la duplicación del gen *PMP22*, han reportado que este tipo de CMT es consistente con una degeneración de las capas de mielina, lo cual se evidencia a través de las velocidades de conducción nerviosa muy disminuidas (Arenas *et al.* 2008, Leyva *et al.* 2003, Keckarevic *et al.* 2009, Nicolau *et al.* 2010). Cinco de los pacientes detectados con esta duplicación

presentan neuropatía desmielinizante lo cual es consistente con la literatura. Sin embargo, una paciente presentó neuropatía mixta, esto podría deberse a una incorrecta evaluación de la electromiografía o quizá porque se ha observado que con el tiempo una neuropatía inicialmente desmielinizante puede ir ocasionando daños en el axón o viceversa, comprometiendo toda la fibra nerviosa.

Resultado de la Electromiografía



Principales Características Fenotípicas

- Manifestaciones clínicas severas.
- Evolución rápidamente progresiva.
- Edad de inicio: primera década.
- Piel laxa y voz ronca.
- Primeras manifestaciones: deformidades de pies y dificultad de marcha.
- Ortesis y silla de ruedas alrededor de la segunda década.
- Atrofia simétrica distal, *pes cavus*, dedos de martillo adelgazamiento de extremidades.
- Reflejos osteotendinosos: hiporreflexia y sensibilidad disminuida.

Sí

No

Principales Características Fenotípicas

- Manifestaciones severas.
- Edad de inicio: segunda y cuarta década.
- Dificultad de marcha por severa debilidad en extremidades inferiores.
- Mayor severidad en extremidades inferiores.
- Déficit sensorial por vibración, posición y dolor.

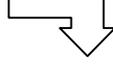
Sí

60

Anál. Genético:
Gen: *GDAP1*

Exones: 4 y 5

Mutaciones:
487C>T (Q163X)
5841C>G (S194X)



Anál. Genético:
Gen: *MED25*

Exón: 9

Mutación:
1004C>T
(Ala335Val)

60

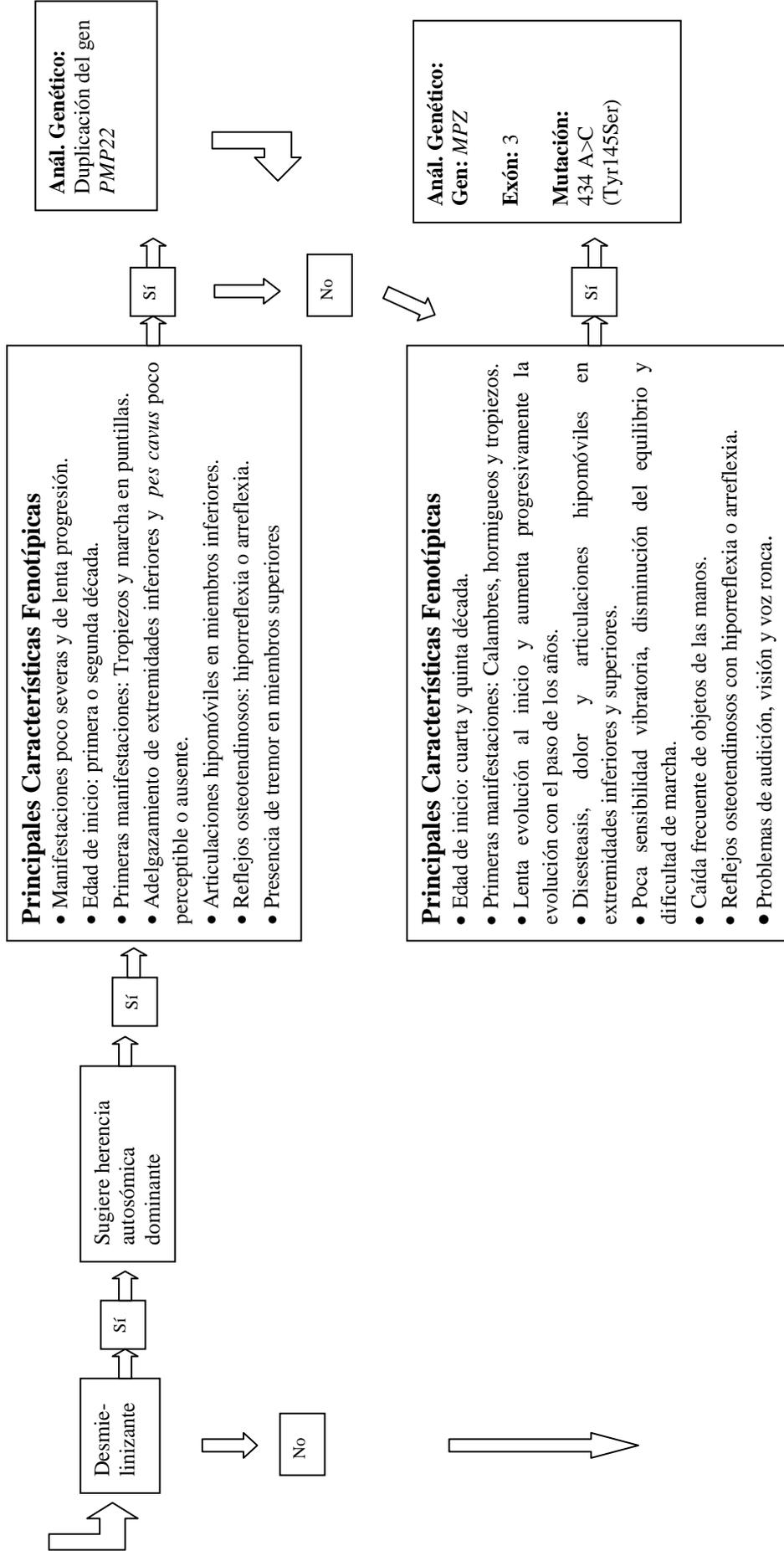
Principales Características Fenotípicas

- Manifestaciones poco severas y de lenta progresión.
- Articulaciones hipomóviles y equilibrio alterado.
- Adelgazamiento, dolor y atrofia simétrica distal de extremidades inferiores.
- Pie arco alto y dificultad de marcha.
- Presencia de temblor en extremidades superiores.
- Reflejos osteotendinosos: Normorreflexia o hiporreflexia
- Pérdida leve de sensibilidad.
- Presencia de diadocokinesia
- Presencia de Disestasis

SÍ

Sugiere herencia dominante ligada al Cs X

Sí



Principales Características Fenotípicas

- Manifestaciones clínicas severas.
- Evolución rápidamente progresiva.
- Edad de inicio: primera década.
- Piel laxa y voz ronca.
- Primeras manifestaciones: deformidades de pies y dificultad de marcha.
- Ortesis y silla de ruedas alrededor de la segunda década.
- Atrofia simétrica distal, *pes cavus*, dedos de martillo adelgazamiento de extremidades.
- Reflejos osteotendinosos: hiporreflexia y sensibilidad disminuida.

Anál. Genético:
Gen: *GDAPI*
Exones: 4 y 5
Mutaciones:
487C>T (Q163X)
5841C>G (S194X)

Sí



No

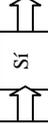


Principales Características Fenotípicas

- Manifestaciones severas.
- Edad de inicio: segunda y cuarta década.
- Dificultad de marcha por severa debilidad en extremidades inferiores.
- Mayor severidad en extremidades inferiores.
- Déficit sensorial por vibración, posición y dolor.

Anál. Genético:
Gen: *MED25*
Exón: 9
Mutación:
1004C>T
(Ala335Val)

Sí

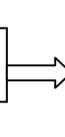


Principales Características Fenotípicas

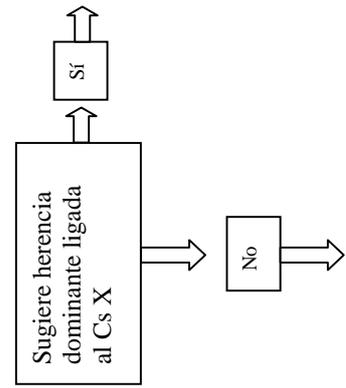
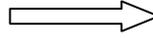
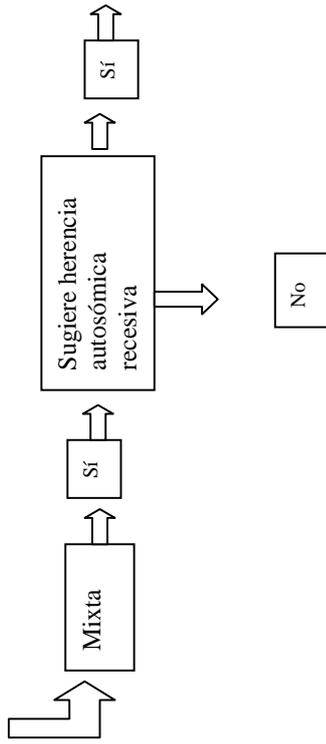
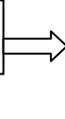
- Manifestaciones poco severas y de lenta progresión.
- Articulaciones hipomóviles y equilibrio alterado.
- Adegazamiento, dolor y atrofia simétrica distal de extremidades inferiores.
- Pie arco alto y dificultad de marcha.
- Presencia de temblor en extremidades superiores.
- Reflejos osteotendinosos: Normorreflexia o hiporreflexia
- Pérdida leve de sensibilidad.
- Presencia de diadocokinesia
- Presencia de Disestasis

Anál. Genético:
Gen: *GJBI*
Exón: 2
Mutación: 37G>A
(Val13Met)

Sí



No



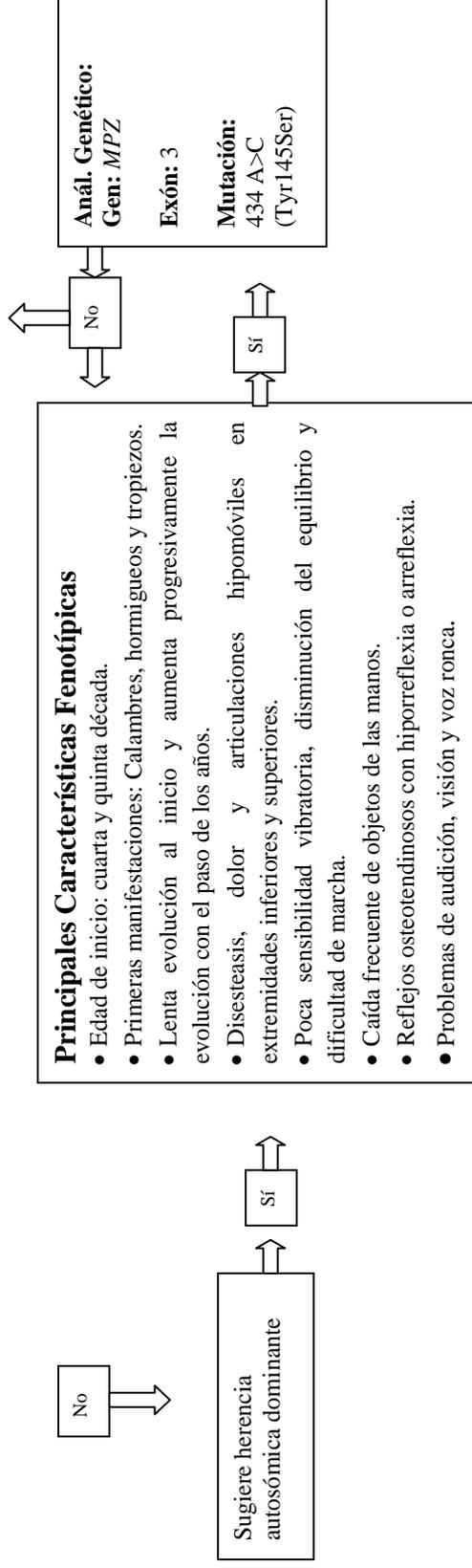


Figura 20. Clave dicotómica generada para realizar la estrategia de seguimiento de búsqueda de mutaciones en pacientes con CMT.

6.7. Correlación fenotipo (sintomatología) genotipo (presencia de mutación) en los pacientes con CMT

El análisis de coordenadas principales muestra la variabilidad existente entre el fenotipo de pacientes con el mismo genotipo así como la variabilidad fenotípica entre genotipos distintos. Para que este análisis sea considerado como una herramienta con poder estadístico aceptado, es necesario que la sumatoria de los dos primeros componentes explique suficiente de la variación, en el mejor de los casos de un 50% o más entre ambos (Legendre & Legendre 1998). Se obtuvo para el primer componente un 31,6% y para el segundo componente 17,4%, resultando una sumatoria de los ejes del 49%, lo cual nos indica que estos datos, nos pueden dar una noción del comportamiento en general de la relación completa del fenotipo y el genotipo de los pacientes, ya que sería necesario una mayor cantidad de muestra para determinar significativamente las relaciones entre estos (Fig. 16 y 17).

La prueba estadística ANOSIM, toma los datos fenotípicos expresados en una matriz de similitudes mixta, para comparar los casos entre y dentro de cada mutación, con el fin de determinar si la mutación hallada en cada gen produce un cambio en la sintomatología de los pacientes y de ser así, identificar de cuanto es esa diferencia. En los datos analizados solamente encontramos diferencia significativa entre los genes *MPZ* y *PMP22*, *MPZ* y *GJB1*, aunque con un bajo porcentaje de similitud (19% y 27% respectivamente), el resto de análisis no evidenciaron siquiera diferencias significativas (Cuadro 6 y 7), quizá porque solamente un paciente representa cada categoría.

El poder que tiene una prueba estadística para determinar si existe diferencia significativa en cierta relación, está dado en gran parte por el tamaño de muestra y además que este sea representativo. En la colecta de muestras para este estudio no se logró la toma de una muestra mayor y de carácter representativo debido a la complejidad respecto a la ubicación de los pacientes con CMT, lo cual posiblemente hace que los análisis cuantitativos realizados en

este estudio no arrojen datos significativos. Además, un tamaño de cuatro muestras por grupo es el mínimo necesario para que el resultado de las comparaciones sea robusto (Quinn & Keough 2002), pero en el software empleado (PAST) es posible incluir grupos con menor cantidad para el resultado general de la prueba (Hammer *et al.* 2001).

A pesar del bajo porcentaje de significancia obtenido en las pruebas estadísticas, estos resultados de tipo cuantitativo aunado a los datos clínicos cuantitativos del análisis de la electromiografía y la evaluación clínica cualitativa que realiza el neurólogo, se postulan como una herramienta útil para determinar las correlaciones entre el fenotipo y el genotipo de los pacientes con CMT.

7. CONCLUSIONES

La presente investigación se realizó con el propósito de determinar si el origen molecular de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth en un grupo de pacientes de la población costarricense estaba en mutaciones en los genes *MPZ*, *MED25*, *GJB1*, *GDAP1* y la duplicación del gen *PMP22*. Además, se pretendió evaluar el fenotipo de los pacientes que presentan mutaciones en estos genes con el fin de establecer las relaciones entre el genotipo y el fenotipo en los pacientes con CMT y con ello establecer un protocolo de seguimiento para el análisis de mutaciones en futuros pacientes en Costa Rica (Anexo 3, Fig. 20).

Tomando en cuenta los estudios anteriores en nuestro país, se ha logrado hacer el diagnóstico molecular de CMT en 20 familias (Fig.14). Se han determinado 7 diferentes mutaciones en los 5 genes evaluados hasta el momento, 4 de ellas con herencia autosómica dominante (Thr124Met y Tyr145Ser en el gen *MPZ* y la duplicación del gen *PMP22*), 3 autosómicas recesivas (Ala335Val en el gen *MED25*, Gln163X y Ser194X en el gen *GDAP1*) y 2 ligadas al cromosoma X (Val13Met y Glu186Lys).

Al realizar el análisis genético en las muestras de los pacientes diagnosticados con CMT, se logró determinar en 17 pacientes la causa genética del padecimiento, detectando mutaciones en los cinco genes evaluados.

Por medio de análisis genealógicos se logró relacionar al paciente 1027 el cual es homocigoto para el cambio Ala335Val del gen *MED25*, a la familia de Palmares en la que se encontró la misma mutación como responsable de la enfermedad, por lo que se puede afirmar que esa familia cuenta con un afectado más. Así mismo, esta mutación es de nuestro interés debido a que solamente ha sido encontrada en estado homocigoto en los pacientes con CMT en nuestro país.

En esta investigación, se logró determinar la presencia de nuevas mutaciones en nuestro país, tal es el caso de las mutaciones Gln163X/Ser194X

presentes en el gen *GDAP1*, la mutación Val13Met en el gen *GJB1* que se encuentra ligado al cromosoma X y la duplicación del gen *PMP22*, la cual es de suma importancia debido a que es la mutación más frecuentemente reportada a nivel mundial en los pacientes de CMT.

A pesar de que los análisis estadísticos presentaron bajo nivel de similitud estos son sugerentes de una correlación fenotipo-genotipo. Con la ampliación del tamaño de muestra de este estudio, quizá se podría comprobar la tendencia entre las variables fenotípicas analizadas y el genotipo.

Además, este estudio permitió determinar que la complementariedad de los análisis clínicos cualitativos así como un apropiado análisis de la electromiografía, realizados por el neurólogo, nos permite realizar una adecuada o más acertada escogencia de la secuencia de genes a analizar, acelerando la identificación de la causa de la neuropatía en los pacientes, así como reduciendo los gastos que conlleva el análisis de mutaciones.

Por su parte, esta investigación es pionera en la búsqueda de mutaciones causantes de CMT en Costa Rica, con el fin de realizar un protocolo para diagnóstico molecular de CMT, lo cual procura colaborar con nuestro sistema de salud, debido a que el panel de mutaciones, así como el protocolo de seguimiento, y la clave dicotómica generados con esta investigación y la literatura consultada, se pretende que sean utilizados para el diagnóstico de la enfermedad de CMT por parte de la Caja Costarricense de Seguro Social, de manera más eficiente y temprana, con el fin de ofrecer consejo genético y un mejor seguimiento de los pacientes diagnosticados por genética molecular (Anexo 3, Fig. 20).

Dado que en el mundo se han descrito unos 30 genes causantes de la enfermedad de CMT, este estudio es para nuestro país y para Latinoamérica, un estudio fundamental en el cual pueden basarse para futuras evaluaciones, incluyendo el análisis de los otros genes involucrados con CMT, y así mejorar la estrategia de búsqueda de la causa de las neuropatías periféricas hereditarias.

8. BIBLIOGRAFÍA

Anónimo. 2007. Inherited Peripheral Neuropathies Database. University of Antwerp. Bélgica. (Consultado 10 de octubre 2010, <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/default.cfm>).

Arenas, M., E. Hernández, R. Gómez, M. Valdés, S. Lona & M. Castillo. 2008. Estudio molecular de una familia con una duplicación del gen *PMP22* y gran variabilidad fenotípica. *Cirugía y Cirujanos* 76: 443-447

Banchs, I., C. Casasnovas, A. Albert, L. De Jorge, M. Povedano, J. Montero, J. Martínez & V. Volpini. 2009. Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 985415, 10p.

Barboza, N., F. Albertazzia, J. Sibaja, F. Mora, C. Astorga & P. Ramírez. 2012. Analysis of genetic diversity of Cucurbitamoschata (D.) germplasm accessions from Mesoamerica revealed by PCR SSCP and chloroplast sequence data. *Scientia Horticulturae* 134: 60–71.

Berghoff, C., M. Berghoff, A. Leal, B. Morera, R. Rei, B. Neundorfer, B. Rautenstraussb, G. Del Valle & Dieter Heuss. 2004. Clinical and electrophysiological characteristics of autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease (ARCMT2B) that maps to chromosome 19q13.3. *Neuromuscular Disorders* 14: 301–306.

Bienfait, H., C. Faber, F. Baas, A. Gabreëls, J. Koelman, J. Hoogendijk, J. Verschuuren, J. Wokke & M. Visser. 2006. Late onset axonal Charcot Marie Tooth phenotype caused by a novel myelin protein zero mutation. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 77:534–537.

- Boerkoel C., H. Takashima, M. Nakagawa, S. Izumo, D. Armstrong, I. Butler, P. Mancias, S. Papasozomenos, L. Stern, & J. Lupski. 2003. CMT4A: identification of a Hispanic *GDAP1* founder mutation. *Ann Neurol* 53:400–5.
- Bolino, A., A. Bolis, S. Previtali, G. Dina, S. Bussini, G. Dati, S. Amadio, U. Del Carro, D. Mruk, M. Feltri, C. Yan Cheng, A. Quattrini & L. Wrabetz. 2004. Disruption of *Mttr2* produces CMT4B1-like neuropathy with myelin outfoldings and impaired spermatogenesis. *The Journal of Cell Biology* 167: 711–721.
- Bone, L., N. Dahl, M. Lensch, P. Chance, T. Kelly, E. Le Guern, S. Magi, G. Parry, H. Shapiro, S. Wang & K. Fischbeck. 1995. New connexin 32 mutations associated with X-linked Charcot–Marie–Tooth disease. *Neurology* 45:1863–1866.
- Bouhouche, A., N. Birouk, H. Azzedine, A. Benomar, G. Durosier, D. Ente, M. Muriel, M. Ruberg, I. Slassi, M. Yahyaoui, O. Dubourg, R. Ouazzani & E. LeGuern. 2007. Autosomal recessive axonal Charcot Marie Tooth disease (ARCMT2): phenotype genotype correlations in 13 Moroccan families. *Brain* 130: 1062-1075.
- Braathen, G., J. Sand, A. Lobato, H. Hoyer & M. Russell. 2011. Genetic epidemiology of Charcot Marie Tooth in the general population. *European Journal of Neurology* 18:39-48.
- Cassereau J., A. Chevrollier, N. Gueguen, V. Desquiret, C. Verny, G. Nicolas, F. Dubas, P. Amati-Bonneau, P. Reynier, D. Bonneau & V. Procaccio. 2011. Mitochondrial dysfunction and pathophysiology of Charcot–Marie–Tooth disease involving *GDAP1* mutations. *Experimental Neurology* 227: 31–41.
- Claramunt, R.; L. Pedrola, T. Sevilla, A. López, J. Berciano, A. Cuesta, B. Sánchez, J. Millan, G. Saifi, J. Lupski, J. Vilchez, C. Espinós & F. Palau. 2005. Genetics of

Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J Med Genet* 42:358–365.

Clarke, K., & R. Warwick. 1994. *Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation*. Bourne, England. p 144.

Cuesta, A., L. Pedrola, T. Sevilla, J. García, M. Chumillas, F. Mayordomo, E. Le Guern, I. Marín, J. Vílchez & F. Palau. 2002. The gene encoding ganglioside induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nature Genetics* 30: 22-25.

Engelfried, K., M. Vorgerd, M. Hagedorn, G. Haas, J. Gilles, J. Epplen & M. Meins. 2006. Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A: novel mutations in the mitofusin 2 gene (MFN2). *BMC Medical Genetics*. 7:53.

Fuller, G. 2010. *Exploración Neurológica Fácil*. Elsevier Health Sciences. España. p 256.

Gallardo, E., A. García, C. Ramón, E. Maraví, J. Infante, I. Gastón, A. Alonso, O. Combarros, P. De Jonghe & J. Berciano. 2009. Charcot–Marie–Tooth disease type 2J with MPZ Thr124Met mutation: clinico-electrophysiological and MRI study of a family. *J Neurol*. 256:2061-71.

González, P., C. Espinos & F. Palau. 2005. *Fisiopatología Molecular y Terapia en las Enfermedades Neurogenéticas. Del Conocimiento Fisiopatológico al Tratamiento*. *Neurol. Supl.* 1:51-60.

Hammer, O, D. Harper & P. Ryan. 2001. *Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis*. *Paleontología Electrónica* 4: 9pp.

Hernández, E & M. Arenas. 2008. El diagnóstico de las neuropatías periféricas hereditarias y la genética molecular. *Acta Ortopédica Mexicana* 22: 268-277.

Ira, S. 2008. *Fisiología Humana*. Mc Graw-Hill. España.

Jones, E., S. Jang, G. Mager, L. Chang, R. Srinivasan, N. Gokey, R. Ward, R. Nagarajan & J. Svaren. 2007. Interactions of Sox10 and Egr2 in Myelin Gene Regulation. *Neuron. Glia. Biol.* 3: 377–387.

Jordanova, A., F. Thomas, V. Guergeltcheva, I. Tournev, F. Gondim, B. Ishpekova, E. De Vriendt, A. Jacobs, I. Litvinenko, N. Ivanova, B. Buzhov, P. De Jonghe, I. Kremensky & V. Timmerman. 2003. Dominant Intermediate Charcot-Marie-Tooth Type C maps to chromosome 1p34-p35. *Am. J. Hum. Genet.* 73: 1423–1430.

Keckarevic, M., V. Milic, J. Mladenovic, J. Dackovic, M. Kecmanovic, D. Keckarevic, D. Savic & S. Romac. 2009. Mutational analysis of *GJB1*, *MPZ*, *PMP22*, *EGR2*, and *LITAF/SIMPLE* in Serbian Charcot-Marie-Tooth patients. *Journal of the Peripheral Nervous System* 14:125–136.

Kurihara, S., Y. Adachi, C. Imai, H. Araki, N. Hattori, C. Numakura, Y. Lin, K. Hayasaka, G. Sobue & K. Nakashima. 2004. Charcot-Marie-Tooth families in Japan with *MPZ* Thr124Met mutation. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 75:1492–1494.

Kwon, J., K. Chung, E. Park, S. Park & B. Choi. 2009. Charcot-Marie-Tooth 1A Concurrent with Schwannomas of the Spinal Cord and Median Nerve. *J Korean. Med. Sc.* 24: 763-6

Leal, A., B. Morera, G. Del Valle, D. Heuss, C. Kayser, M. Berghoff, R. Villegas, E. Hernández, M. Méndez, H. Hennies, B. Neundorfer, R. Barrantes, A. Reis & B.

2001. A Second Locus for an Axonal Form of Autosomal Recessive Charcot-Marie-Tooth Disease Maps to Chromosome 19q13.3. *Am. J. Hum. Genet.* 68:269–274.

Leal, A., C. Berghoff, M. Berghoff, G. Del Valle, C. Contreras, O. Montoya, E. Hernández, R. Barrantes, U. Schlötzer-Schrehardt, B. Neundörfer, A. Reis, B. Rautenstrauss & D. Heuss. 2003. Charcot-Marie-Tooth disease: a novel Tyr145Ser mutation in the myelin protein zero (*MPZ*, *P0*) gene causes different phenotypes in homozygous and heterozygous carriers within one family. *Neurogenetics.* 4: 191-197.

Leal, A. 2004. Genetics of hereditary motor and sensory neuropathy and the Costa Rican contribution. *Rev. Biol. Trop.* 52: 475-483.

Leal, A., T. Ichim, A. Marleau, F. Lara, S. Causal & N. Riordan. 2008. Immune effects of mesenchymal stem cells: Implications for Charcot–Marie–Tooth disease. *Cellular Immunology.* 25:11-15.

Leal, A., K. Huehne, F. Bauer, H. Sticht, P. Berger, U. Suter, B. Morera, G. Del Valle, J. Lupski, A. Ekici, F. Pasutto, S. Endele, R. Barrantes, C. Berghoff, M. Berghoff, B. Neundörfer, D. Heuss, T. Dorn, P. Young, L. Santolin, T. Uhlmann, M. Meisterernst, M. Sereda, G. Horste, K. Nave, A. Reis & B. Rautenstrauss. 2009. Identification of the variant Ala335Val of *MED25* as responsible for CMT2B2: molecular data, functional studies of the SH3 recognition motif and correlation between wild-type *MED25* and *PMP22* RNA levels in CMT1A animal models. *Neurogenetics.* 10: 275–287.

Legendre, P., Legendre, L, 1998. Numerical ecology, second English ed. Elsevier Science BV, msterdam, p. 853

Legendre, P & E. Gallagher. 2001. Ecologically meaningful transformations for ordinations of species data. *Oecologia* 129: 271–280.

Leyva, A., N. González, E. Hernández, S.Kofman, M. Bautista, A. Gálvez & S. Cuevas. 2003. Detección de la duplicación génica de PMP22 mediante hibridación in situ en pacientes con Charcot-Marie-Tooth. *Rev Med Hosp Gen Mex* 66: 187-191.

Maier, M.,P. Berger & U. Suter.2002. Understanding Schwann cell–neurone interactions: the key to Charcot–Marie–Tooth disease. *Anat.* 200: 357–366.

Mersiyanova I., S. Ismailov, A. Polyakov, E. Dadali, V. Fedotov, E. Nelis, A. Löfgren, V. Timmerman, C. Van Broeckhoven & O. Evgrafov O. 2000. Screening for mutations in the peripheral myelin genes PMP22, MPZ and Cx32 (GJB1) in Russian Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients. *Hum Mutat.* 15:340-7.

Muscular Dystrophy Association (MDA). 2009. Charcot-Marie- Tooth Disease & Related Diseases.Estados Unidos (Consultado 20 de octubre 2011, <http://www.mdausa.org/publications/fa-cmt-what.html#top>).

Miller, S., D. Dykes & H. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research.*16:1215.

Myers, J., C. Mobley & C. Sanders. 2008. The Peripheral Neuropathy-Linked Trembler and Trembler-J Mutant Forms of Peripheral Myelin Protein 22 are Folding- Destabilized. *Biochemistry.* 47: 10620–10629.

Nelis, E., V. Timmerman, P. De Jonghe, A. Vandenberghe, D. Pham-Dinh , A. Dautigny, J. Martin & C. Van Broeckhoven. 1994. Rapid screening of myelin genes

in CMT1 patients by SSCP analysis: identification of new mutations and polymorphisms in the P0 gene. *Hum Genet.* 94:653-7.

Nelis, E., S. Erdem, P. Van Den Bergh, M. Belpaire-Dethiou, C. Ceuterick, V. Van Gerwen, A. Cuesta, L. Pedrola, F. Palau, A. Gabreels-Festen, C. Verellen, E. Tan, M. Demirci, C. Van Broeckhoven, P. De Jonghe, H. Topaloglu & V. Timmerman. 2002. Mutations in GDAP1: autosomal recessive CMT with demyelination and axonopathy. *Neurology* 59:1865–72.

Nicolaou, P., E. Zamba, P. Koutsou, K. Kleopa, A. Georghiou, G. Hadjigeorgiou, A. Papadimitriou, T. Kyriakides & K. Christodoulou. 2010. Charcot-Marie-Tooth Disease in Cyprus: Epidemiological, Clinical and Genetic Characteristics. *Neuroepidemiology* 35:171–177.

Okuda, T., K. Kokame & T. Miyata. 2008. Differential Expression Patterns of NDRG Family Proteins in the Central Nervous System. *J. Histochemistry & Cytochemistry* 56: 175–182.

Palau. 2005. Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J. Med. Genet.* 42:358–365.

Pareyson, D. 2004. Differential diagnosis of Charcot-Marie-Tooth Disease and Related Neuropathies. *Neurol Sci.* 25:72-82.

Pareyson, D., & C. Marchesi. 2009. Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *Lancet. Neurol.* 8:654-67.

Pareyson, D; M. Reilly, A. Schenone, G. Fabrizi, T. Cavallaro, L. Santoro, G. Vita, A. Quattrone, L. Padua, F. Gemignani, F. Visioli, M. Laurà, D. Radice, D. Calabrese, R. Hughes & A. Solari. 2011. Ascorbic acid in

Charcot–Marie–Tooth disease type 1A (CMT-TRIAAL and CMT-TRAUK): a double-blind randomised trial. *Lancet Neurol* 10: 320-8.

Patzkó, A & M. Shy. 2011. Update on Charcot-Marie-Tooth Disease. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep* 11:78–88.

Pedrola, L., A. Esperta, T. Valdés, M. Sánchez, E. Sirkowskie, S. Scherere, I. Fariñasc & F. Palau. 2008. Cell expression of GDAP1 in the nervous system and pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *J. Cell Mol. Med.* 12: 679–689.

Rautenstrauss, B., M. Auer-Grumbach, P. Seeman, A. Leal, K. Hühne, P. Lassuthova & V. Timmerman. 2010. Draft Best Practice Guidelines for Molecular Analysis of Charcot-Marie-Tooth and related Neuropathies. (enprensa).

Reilly, M & M. Hanna. 2002. Genetic Neuromuscular Disease. *J NeurolNeurosurg Psychiatry* 73:12- 21.

Reilly, M. 2009. Classification and diagnosis of the inherited neuropathies. *Ann Indian Acad Neurol.* 12: 80–88.

Robaglia, A., J. Pizant, J. Norreel, E. Passage, D. Saberan, J. Ansaldi, L. Vinay, D. Figarella, N. Levy, F. Clarac, P. Cau, J. Pellissier & M. Fontes. 2002. PMP22 overexpression causes dysmyelination in Mice. *Brain* 125:2213-2221.

Robinson, F., I. Niesman, K. Beiswenger & J. Dixon. 2008. Loss of the inactive myotubularin-related phosphatase Mtmr13 leads to a Charcot–Marie–Tooth 4B2-like peripheral neuropathy in mice. *PNAS.* 105: 4916–4921.

Rojas, M., R. Araya, R. Bonilla, S. Campos, C. Centeno, C. Del Valle, J. Pacheco, A. Saborío, J. Vega, H. Fernández & A. Leal. 2009. Frecuencia del alelo causante de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (tipo axonal con herencia autosómica recesiva) en Palmares, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 1: 381-387.

Sahin, N., M. Tan, M. Soyoz, M. Calapoglu & N. Ozcelik. 2009. Novel GDAP1 Mutation in a Turkish Family with CMT2K (CMT2K with Novel GDAP1 Mutation). *NeuromolMed* 11:106–113.

Santoro, L., F. Manganelli, E. Di Maria, D. Bordo, D. Cassandrini, F. Ajmar, P. Mandich & E. Bellone. 2004. A novel mutation of myelin protein zero associated with an axonal form of Charcot–Marie–Tooth disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 75:262–265.

Schrer, S & L. Wrabetz. 2008. Molecular Mechanisms of Inherited Demyelinating Neuropathies. *Glia.* 56: 1578–1589.

Senderek, J., C. Bergmann, V. Ramaekers, E. Nelis, G. Bernert, A. Makowski, S. ZuÈchner, P. De Jonghe, S. Rudnik-SchoÈneborn, K. Zerres & M. SchroÈder. 2003. Mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 (GDAP1) gene in intermediate type autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain* 126: 642-649

Sevilla, T., A. Cuesta, M. Chumillas, F. Mayordomo, L. Pedrola, F. Palau & J. Vilchez. 2003. Clinical, electrophysiological and morphological findings of Charcot Marie Tooth neuropathy with vocal cord palsy and mutations in the GDAP1 gene. *Brain* 126: 2023-2033

Skre, H. 1974. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin. Genet.* 6: 98-118.

Shy, M., J. Garbern & J. Kamholz. Hereditary motor and sensory neuropathies: a biological perspective. *Lancet Neurology* 1: 110–18

Starr, A; H. Michalewski, F. Gang, S. Fujikawa, Brooks, F. Linthicum, C. Kim, D. Winnier & B. Keats. 2003. Pathology and physiology of auditory neuropathy with a novel mutation in the MPZ gene (Tyr145→Ser). *Brain* 126:1604-19.

Song, S., Y. Zhang, B. Chen, Y. Zhang, M. Wang, Y. Wang, M. Yan, J. Zou, Y. Huang & N. Zhong. 2006. Mutation frequency for Charcot Marie Tooth disease type 1 the Chinese population is similar to that in the global ethnic patients. *Genetics in Medicine* 8: 532-540.

Szigeti, K & J. Lupski. 2009. Charcot–Marie–Tooth disease. *Eur J Hum Genet.* 17: 703–710.

Tsao, B., N. Boulis, F. Bethoux & B. Murray. 2008. *Bradley: Neurology in Clinical Practice*. 5^{ed}. US. Butterworth-Heinemann Elsevier. pp1145.

Ueda, G. 2008. Peripheral mechanisms of neuropathic pain – involvement of lysophosphatidic acid receptor-mediated demyelination. *Molecular Pain* 4:11.

Vavlitou, N., I. Sargiannidou, K. Markoullis, K. Kyriacou, S. Scherer & K. Kleopa. 2010. Axonal Pathology Precedes Demyelination in a Mouse Model of X-Linked Demyelinating/ Type I Charcot-Marie Tooth (CMT1X) Neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 69: 945–958.

Visser, M & C. Verhamme. 2011. Ascorbic acid for treatment in CMT1A: what's next?. *Lancet Neurol* 10: 291-3.

Ward, C., L. Dolan, L. Bennett, J. Morcuende & R. Cooper. 2008. Long-Term Results of Reconstruction for Treatment of a Flexible Cavovarus Foot in Charcot-Marie-Tooth Disease. *Bone Joint Surg Am.* 90: 2631–2642.

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1. Consentimiento Informado utilizado para el estudio de CMT

FORMULA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

(Para ser sujeto de investigación)

DETERMINACIÓN DE LA CAUSA GENÉTICA DE NEUROPATIAS PERIFERICAS HEREDITARIAS

Código del Proyecto 111-A4-334

Nombre del Investigador Principal: Dr. Alejandro Leal Esquivel

Nombre del Paciente: _____ Código: _____

A. PROPÓSITO DEL PROYECTO

El objetivo del proyecto es buscar alguna mutación (cambio genético) en pacientes que presentan una enfermedad en el sistema nervioso periférico (fuera del sistema nervioso central o cerebro).

La idea es tratar de encontrar la causa genética de estas enfermedades. Se revisarán, en orden de prioridad, los genes que podrían estar causando esta enfermedad en el paciente, con el fin de identificar la mutación responsable. Debido a la gran cantidad de genes involucrados en estas enfermedades, y considerando que muchos de estos aún no están bien estudiados, no se puede garantizar que se encontrarán las mutaciones responsables, ni tampoco se puede asegurar que los pacientes van a recibir un tratamiento que les cure la enfermedad luego de realizado este diagnóstico. No obstante, esta investigación podría dar las bases para desarrollar futuras terapias y permitirá el diagnóstico de personas que no están enfermas pero tienen un gen mutado (portadores). El investigador principal de este proyecto es el Dr. Alejandro Leal Esquivel, genetista, y los

profesores asociados son el Dr. Gerardo Del Valle Carazo, neurólogo de NEUROLAB y el Dr. Jorge Azofeifa Navas, genetista.

B. ¿QUÉ SE HARÁ?

Si acepta participar en este estudio, se realizará lo siguiente:

- a) Se le hará entrevista con datos generales del paciente, de historia familiar, y de datos clínicos. Esta entrevista será de carácter confidencial y la información suministrada se utilizará para los fines de este estudio.
- b) Se tomará una muestra de sangre de 10 mL (por ejemplo, dos tubos de 5 mL c/u), de sangre periférica (a extraerse del brazo).

C. RIESGOS

La participación en este estudio puede significar molestia por lo siguiente: el tomar la muestra de sangre puede causar ardor por la punción, y causar un pequeño moretón.

D. BENEFICIOS

Como resultado de su participación en este estudio, el beneficio que obtendrá será saber si la mutación causante de la neuropatía que sufre, está en uno de los genes probados. Esta información podría ser utilizada para detectar portadores en el resto de la familia, si esto es deseado. También, identificando la mutación causante, podrían hacerse, en un futuro, sugerencias terapéuticas que beneficien al paciente o a otros pacientes. No obstante, no se obtendrá un beneficio directo de tratamiento a raíz del resultado de diagnóstico.

E. Antes de dar la autorización para este estudio usted debe haber hablado con el Dr. Alejandro Leal Esquivel o con alguno de sus investigadores sobre este estudio y ellos deben haber contestado satisfactoriamente todas sus preguntas. Si quisiera más información más adelante, puede obtenerla llamando al investigador principal al teléfono: 2207-4043 (de 8 am a 12 m o de 1 a 5 pm). Además, puede

consultar sobre los derechos de los Sujetos Participantes en Proyectos de Investigación al CONIS- Consejo Nacional de Salud del Ministerio de Salud, teléfonos 2223-3594,22230333 ext. 292, de lunes a viernes de 8 a.m a 4 p.m. Cualquier consulta adicional puede comunicarse a la Vicerrectoria de Investigación de la Universidad de Costa Rica a los teléfonos 2207-4201 o 2207-5839 de lunes a viernes de 8 a.m a 5 p.m

F. Recibirá una copia de esta fórmula para su uso personal.

G. Su participación en este estudio es voluntaria. Tiene derecho de negarse a participar en cualquier momento, sin que esta decisión afecte la calidad de la atención médica que requiera.

H. Su participación en este estudio es confidencial, los resultados podrían aparecer en una publicación científica o ser divulgados en una reunión científica pero de manera anónima.

I. No perderá ningún derecho legal por firmar este documento

J. ¿Autoriza en caso de necesidad, la información y las muestras obtenidas para esta investigación puedan transferirse a otros investigadores bajo el acuerdo de Transferencia de Material Biológico (MTA) siempre que se respete totalmente su confidencialidad?

(Independientemente de su respuesta, Ud. podrá participar en este estudio)

Si _____ No _____

K. ¿Autoriza el uso de material genético para otros estudios relacionados con la enfermedad siempre que se proteja su confidencialidad? (Independientemente de su respuesta, Ud. podrá participar en este estudio)

Si _____ No _____

CONSENTIMIENTO

He leído o se me ha leído, toda la información descrita en esta fórmula, antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por lo tanto, accedo a participar como sujeto de investigación en este estudio

Nombre, cédula y firma del sujeto (niños mayores de 12 años y adultos) fecha

Nombre, cédula y firma del testigo fecha

Nombre, cédula y firma del Investigador que solicita el consentimiento fecha

Nombre, cédula y firma de padres/representante legal (menor de edad) fecha

NUEVA VERSION FCI-APROBADA EN SESION DEL COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO (CEC) NO
53 REALIZADA EL 03 DE SETIEMBRE DEL 2003

GRC-Form.Consent.Inform3-9-03

9.2 Anexo 2. Hoja de Recolección de datos del Estudio de la Enfermedad Charcot Marie Tooth.

HOJA DE RECOLECCION DATOS-ESTUDIO ENFERMEDAD CHARCOT MARIE TOOTH

Identificación

Nombre: _____

Código paciente. _____

Edad: _____ Sexo: F () M ()

Teléfono: _____

Residencia: _____

Antecedentes familiares

Cardiopatía	Si()	No()
Hipertensión	Si()	No()
Nefropatía	Si()	No()
Neuropatía	Si()	No()
Tuberculosis	Si()	No()
Oncología	Si()	No()
Diabetes	Si()	No()
Retardo mental	Si()	No()
Epilepsia	Si()	No()
Ceguera	Si()	No()
Sordera	Si()	No()
Movimientos anormales	Si()	No()
CMT	Si()	No()
Están sus padres relacionados entre sí (consanguinidad)	Si()	No()
Parentesco: _____		
Familiares afectados:	Si()	No()
Familiares con pie torcido (pie equinovaro)	Si()	No()

Antecedentes personales

Edad inicio síntomas:_____ Edad de diagnostico:_____

Síntomas Iniciales:_____

Evolución de la enfermedad: Lento () Rápido () Constante ()

Antecedentes quirúrgicos:_____

P. Patológicos:_____

Medicación utilizada: _____

Tabaquismo: Si() No()

Alcoholismo: Si() No()

Drogas: Si() No() Cuáles: _____

Problemas cicatrización: Si() No()

Amputaciones: Si() No() Donde:_____

Articulación hipomóviles: Si() No() Cuales:_____

Piel laxa: Si() No()

Voz ronca/P.cuerdas: Si() No()

Dificultad marcha: Si() No()

Alteraciones equilibrio: Si() No()

Caen objetos mano: Si() No() Desde cuándo:_____

Dolor: Si() No() Donde:_____

Manos:_____ Pies_____ Cuerpo: _____

Disestesias: Si() No() Donde:_____

Manos:_____ Pies_____ Cuerpo: _____

Adelg.miembros: Si() No() Donde:_____

Manos:_____ Pies_____ Cuerpo: _____

Examen físico

Peso: _____

Talla: _____

Utiliza lentes		Si ()	No ()
Utiliza audífonos		Si ()	No ()
Reflejo fotomotor	Directo	Normal()	Anormal()
	Consensual	Normal()	Anormal()
Reflejo nauseoso		Presente()	Ausente()
Pares craneales:		Normal()	Anormal()
Disartria:		Si ()	No ()
Atrofia			
	M. superiores	Si ()	No ()
		Simétrica ()	Asimétrica ()
		Proximal ()	Distal()
	M. Inferiores	Si ()	No ()
		Simétrica ()	Asimétrica ()
		Proximal ()	Distal()
Dedos en martillo		Si ()	No ()
Pie arco alto		Si ()	No ()
Pie arco plano		Si ()	No ()
Tremor manos		Si ()	No ()
Fasciculaciones	Facial	Si ()	No ()
	Manos	Si ()	No ()
	Pies	Si ()	No ()

Reflejos osteotendinosos

	Hiporeflexia	Normoreflexia	Hiperflexia
	Clonus		
Tricipital	()	()	()

Bicipital () () () ()
 Rotuliano () () () ()
 Aquileano () () () ()
 Babinsky Si() No()

Sensibilidad

Superficial M. superiores() M.inferiores()
 Profunda M. superiores() M.inferiores()
 Vibratoria M. superiores() M.inferiores()
 Posicional M. superiores() M.inferiores()
 Temperatura M. superiores() M.inferiores()

Palpación nervios engrosados

Cervical () M. superiores () M.inferiores ()

Defecto de columna vertebral

Cifosis() Escoliosis() Hiperlordosis()

Deambula Si() No()
 Normal () Talón () Puntillas ()
 Lineal () Desviación ()

Coordinación

Diadocokinesia Derecha() Izquierda()
 Test dedo-nariz Derecha() Izquierda()
 Test rodilla-talón Derecha() Izquierda()

9.3. Anexo 3. Protocolo de Seguimiento para el Análisis de Mutaciones para la Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth

1.

Tipo de Neuropatía según la Electromiografía

Axonal, (podría determinarse neuropatía mixta con predominancia axonal).

Características Fenotípicas Principales

Manifestaciones clínicas severas en los pacientes.

Edad de inicio de las manifestaciones de CMT entre la segunda y cuarta década.

Severa debilidad en extremidades inferiores, lo cual provoca una progresiva dificultad en la marcha.

Notable diferencia en la afectación entre las extremidades inferiores y superiores, siendo en las extremidades inferiores una severidad mayor.

Presencia de un déficit sensorial por vibración, posición y dolor principalmente.

Patrón de Herencia Mendeliano

Autosómico Recesivo: Sugiere la presencia de ninguno o pocos casos de pacientes con la enfermedad en la familia; salvo la presencia de una alta consanguinidad en la misma.

Análisis Genético Recomendado

Realizar análisis de mutaciones en el gen MED25, para determinar la presencia de la mutación Ala335Val.

Metodología

Realizar una PCR con los primers forward 5'- GTGTGACCTCGTGGGATACC-3' y reverse 5'- CTCTAACTGTCCTAGCTGTGG-3', utilizando los siguientes reactivos y condiciones para la PCR:

Reactivo	Volumen (µl)
Amortiguador 10x	5
dNTPs	1
Iniciador Directo	0.4
Iniciador Reverso	0.4
ADN Polimerasa (5U)	1
Agua	41.2
ADN	1
Total	50 µl

Programa de PCR

95°C 5 min

95°C 30 seg
 60°C 30 seg } 35x
 72°C 35 seg }

72 °C 7 min

Hold 4 °C

1. Tipo de Neuropatía según la electromiografía

Desmielinizante o Mixta

Características Fenotípicas Principales

Edad de inicio de las manifestaciones de CMT en la cuarta y quinta década.

Calambres, hormigueos y constantes tropiezos, son las primeras manifestaciones de la enfermedad.

Lenta evolución al inicio de la enfermedad, pero aumenta progresivamente la evolución conforme el paso de los años.

Disestesia, dolor y articulaciones hipomóviles en extremidades inferiores y superiores.

Poca sensibilidad vibratoria, disminución del equilibrio y dificultad de marcha.

Caída frecuente de objetos de las manos.

Reflejos osteotendinosos con hiporreflexia o arreflexia.

Problemas de audición, visión y voz ronca.

Patrón de Herencia Mendeliano

Autosómico Dominante: Sugiere la presencia de varios casos de pacientes con la enfermedad en la familia.

Análisis Genético Recomendado.

Realizar análisis de mutaciones en el gen MPZ (exón 3), para determinar la presencia de la mutación Tyr145Ser.

Metodología

Realizar una PCR con los primers forward 5'- GGAGCTAAGCTTTGACAGCTGTG -3' y reverse 5'- ATCCCCTCCCAAAGTCTTC -3', utilizando los siguientes reactivos y condiciones para la PCR:

Programa de PCR

Exón 3

95°C 5 min

95°C 30 seg

58°C 30 seg

72°C 30 seg

} 35x

72 °C 7 min

Hold 10 °C

Reactivo	Volumen (µl)
Amortiguador 10x	5
dNTPs	1
Iniciador Directo	0.4
Iniciador Reverso	0.4
ADN Polimerasa	1
Agua	41.2
ADN	1
Total	50 µl

2. Tipo de Neuropatía según la electromiografía

Axonal o Mixto

Características Fenotípicas Principales

Manifestaciones clínicas leves e incluso poco perceptibles.

Evolución lentamente progresiva con el paso de los años.

No presenta un patrón claro de edad de inicio (primera década y en tercer y cuarta década).

Debilidad en miembros superiores, adormecimiento de miembros inferiores y caídas frecuentes, son las primeras manifestaciones de la enfermedad.

Articulaciones hipomóviles, dolor, pérdida de masa muscular y atrofia simétrica distal, en extremidades inferiores.

Pie con arco alto y dificultad de marcha.

Tremor y disesteasis en las extremidades superiores.

Patrón de herencia mendeliano

Ligado al X dominante: Sugiere la presencia de varios casos de pacientes con la enfermedad en la familia.

Análisis Genético Recomendado

Realizar análisis de mutaciones en el gen GJB1, para determinar la presencia de la mutación Val13Met.

Metodología

Realizar una PCR con los primers forward 5'- CCAGCTTTCTGACAGCTTGCT -3' y reverse 5'- CTCAAACAACAGCCGGAACAC -3', utilizando los siguientes reactivos y condiciones para la PCR:

Programa de PCR

Exón 2

95°C 5 min

95°C 30 seg

60°C 30 seg

72°C 30 seg

} 35x

72 °C 7 min

Hold 10 °C

Reactivo	Volumen (µl)
Amortiguador 10x	5
dNTPs	1
Iniciador Directo	0.4
Iniciador Reverso	0.4
ADN Polimerasa	1
Agua	41.2
ADN	1
Total	50 µl

3. Tipo de Neuropatía según la electromiografía

Mixta o Axonal

Características Fenotípicas Principales

Manifestaciones clínicas severas.

Evolución rápidamente progresiva con el paso de los años.

Edad de inicio de las manifestaciones de CMT en la primera década.

Deformidades en los pies y dificultad de marcha, son las primeras manifestaciones de la enfermedad.

Necesidad de ortesis y posteriormente silla de ruedas alrededor de la segunda década.

Atrofia simétrica distal, pes cavus y adelgazamiento de extremidades inferiores

Atrofia simétrica distal, dedos de martillo y adelgazamiento de extremidades superiores.

Reflejos osteotendinosos con hiporreflexia y pruebas de sensibilidad disminuida.

Piel laxa.

Voz ronca

Patrón de herencia mendeliano

Autosómica recesiva: Sugiere la presencia de pocos de pacientes con la enfermedad en la familia.

Análisis Genético Recomendado.

Realizar análisis de mutaciones en el gen GDAP1 (exón 5 y 6), para determinar la presencia de las mutaciones Q163X y S194X.

Metodología

Realizar una PCR para el exón 5 con los primers forward 5'-GGCTGAACTCTGTAAGATTTG -3' y reverse 5'- GACCTAAGAATGTTCCCATG -3', y una PCR para el exón 6 con los primers 5'-GAGACCACTGATACCAGCTGG-3' y reverse 5'- CAGAGAGCCACGGGCAATCAC -3', utilizando los siguientes reactivos y condiciones para la PCR:

Programa de PCR

Exón 5

95°C 5 min

95°C 30 seg }
54°C 30 seg } 35x
72°C 30 seg }

72 °C 7 min

Hold 10 °C

Programa de PCR

Exón 6

95°C 5 min

95°C 30 seg }
63°C 30 seg } 35x
72°C 30 seg }

72°C 7 min

Hold 10 °C

Reactivo (exones 5 y 6)

Amortiguador 10x

dNTPs

Iniciador Directo

Iniciador Reverso

ADN Polimerasa

Agua

ADN

Total

Volumen (µl)

5

1

0.4

0.4

1

41.2

1

50 µl

4. Tipo de Neuropatía según la electromiografía

Desmielinizante

Características Fenotípicas Principales

Manifestaciones clínicas poco severas y de lenta progresión.

Edad de inicio de las manifestaciones de CMT en la primera o segunda década.

Tropiezos y marcha en puntillas, son las primeras manifestaciones de la enfermedad.

Adelgazamiento de extremidades inferiores y pes cavus poco perceptible o ausente.

Articulaciones hipomóviles en miembros inferiores.

Reflejos osteotendinosos presentan hiporreflexia e incluso arreflexia.

Presencia de tremor en miembros superiores

Patrón de Herencia Mendeliano

Autosómica Dominante: Sugiere la presencia de varios casos de pacientes con la enfermedad en la familia.

Análisis Genético Recomendado.

Realizar análisis para determinar si existe la duplicación del gen PMP22.

Metodología

Realizar el análisis a través de la técnica MPLA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).

9.4 Anexo 4. Variables fenotípicas evaluadas en los pacientes con diagnóstico molecular de CMT

- Evolución de la enfermedad
- Consumo de Neurotóxicos
- Problemas de cicatrización
- Articulaciones Hipomóviles
- Piel laxa
- Voz Ronca
- Dificultad de marcha
- Alteraciones del equilibrio
- Caída de Objetos
- Dolor en las manos , pies y cuerpo
- Disestesias en las manos, pies y cuerpo
- Adelgazamiento en las manos, pies y cuerpo
- Audición
- Reflejo fotomotor directo y consensual
- Reflejo Nauseoso
- Pares Craneales
- Disartria
- Atrofia en miembros superiores e inferiores
- Dedos de Martillo
- Arco pie alto o plano
- Tremor en manos
- Fasciculaciones: facial, manos y pies
- Reflejos Osteotendinosos: tricipital, bicipital, rotuliano, aquileano
- Babinsky
- Romberg
- Sensibilidad superficial en manos y pies
- Sensibilidad profunda en manos y pies

- Sensibilidad vibratoria en manos y pies
- Sensibilidad posicional en manos y pies
- Sensibilidad a la temperatura en manos y pies
- Nervios engrosados
- Defectos en Columna vertebral
- Deambulación normal, lineal, desviada, de puntillas o con el talón
- Diadocokinesia
- Test dedo-nariz
- Test rodilla-talón