

DEPARTAMENT GENÈTICA I MEDICINA MOLECULAR

GENÈTICA DE LA ENFERMEDAD DE CHARCOT-MARIE-
TOOTH AUTOSÓMICA RECESIVA

REYES CLARAMUNT ALONSO

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 10 de desembre de 2008 davant un tribunal format per:

- D^a. Rosa de Frutos Illán
- D^a. Montserrat Baiget Bastús
- D. José Berciano Blanco
- D. Juan Jesús Vilchez Padilla
- D. José M^a Millán Salvador

Va ser dirigida per:
D. Francesc Palau Martínez

©Copyright: Servei de Publicacions
Reyes Claramunt Alonso

Depòsit legal:
I.S.B.N.:978-84-370-7448-1
D.L.:V-1339-2009

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

VNIVERSITAT  VALÈNCIA

Departament de Genètica



**INSTITUTO DE
BIOMEDICINA
DE VALENCIA**

**GENÉTICA DE LA ENFERMEDAD DE
CHARCOT-MARIE-TOOTH AUTOSÓMICA
RECESIVA**

Memoria presentada por
Reyes Claramunt Alonso
para optar al grado de Doctora en
Ciencias Biológicas

Valencia, 2008



INSTITUTO DE
BIOMEDICINA
DE VALENCIA

D. Francesc Palau Martínez, Doctor en Medicina y Científico Titular del Instituto de Biomedicina de Valencia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

CERTIFICA: que **Reyes Claramunt Alonso**, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “**Genética de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth autosómica recesiva**”, para la obtención del grado de Doctora en Ciencias Biológicas.

Valencia, a 20 de septiembre de 2008

Dr. Francesc Palau Martínez

“La duda suele ser el principio de la sabiduría”

M. Scott Peck

A mis padres

A M^a José y a Joaquín

Por su gran apoyo y cariño en todo momento

D

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a Paco Palau el haber hecho posible la realización de esta tesis doctoral bajo su dirección, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo, por su ayuda, conocimientos y consejos.

Aprovecho para dar las gracias a todas las personas que de forma directa o indirecta han participado en este trabajo y que sin su ayuda no hubiera sido posible, especialmente a todos los pacientes y familias objeto de esta tesis doctoral.

Gracias a todo el personal y compañeros del Instituto de Biomedicina de Valencia, especialmente a mis compañeros de laboratorio: a Rafa por su optimismo, a Pili por sus buenos consejos, a Toni y Sheila por su predisposición, a Carmina por su ayuda y conocimientos, a Laia por su alegría, amistad y ayuda incondicional para todo, y en especial, a Amalia con quién más horas he compartido en el laboratorio, por su ayuda tanto a nivel profesional como personal y sobretodo, por su amistad.

Agradecer al *Institut de Genètica Mèdica i Molecular (IGEM)*, por haberme abierto las puertas de manera incondicional y haberme permitido conocer e introducirme en el fascinante mundo de la citogenética y genética molecular: a Javier García por sus conocimientos, sus buenos consejos y su amistad, a Fani por todos los momentos que hemos disfrutado, su constante preocupación tanto a nivel personal como profesional y por la gran amistad que hemos forjado, y a ti, Ana Cuesta que has sido mi referente a nivel profesional, con quién he aprendido y sigo aprendiendo, por tu incondicional ayuda para todo, por haberme recomendado para desempeñar el puesto que actualmente ocupo, y sobretodo, y lo que más valoro tu amistad.

Agradecimientos

Gracias a Sistemas Genómicos por permitirme compaginar el trabajo con la investigación y sobretodo, a mis compañeros del laboratorio de citogenética, Fani, Ana, Juan, Concha, Gema, Paloma y Raquel, por soportarme durante este tiempo.

Y como no, agradecer a mis padres y a mi hermana quienes siempre han estado a mi lado, su gran apoyo y comprensión y por haberme facilitado las cosas en todo momento. A mis abuelos, Pepe y Amparo que siempre estarán conmigo, por sus innumerables muestras de cariño, y al resto de mi familia por sus ánimos.

Finalmente, agradecerles a Jaume y a Laura su gran amistad y sus ánimos. Y a ti, Joaquín por estar a mi lado, por tu apoyo incondicional y ayuda en todo momento, y porque ahora si que te puedo decir, YA ESTÁ!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

ABREVIATURAS

ADN:	ácido desoxirribonucleico
ASO:	oligonucleótido específico de alelo
ARCMT:	enfermedad de Charcot-Marie-Tooth con herencia autosómica recesiva
ARCMT2:	enfermedad de Charcot-Marie-Tooth axonal con herencia autosómica recesiva
ARNm:	ARN mensajero
CMT:	enfermedad de Charcot-Marie-Tooth
CMT1:	enfermedad de Charcot-Marie-Tooth desmielinizante con herencia autosómica dominante
CMT2:	enfermedad de Charcot-Marie-Tooth axonal con herencia autosómica dominante
CMT4:	enfermedad de Charcot-Marie-Tooth demielinizante con herencia autosómica recesiva
LOD:	“Logarithm of the odds”
MI/MS:	miembros inferiores/miembros superiores
NSMH:	neuropatía sensitivo motora hereditaria
VCM:	velocidad de conducción nerviosa motora
VCN:	velocidad de conducción nerviosa
ORF:	pauta de lectura abierta
pb:	pares de bases
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
SNP:	polimorfismo de un solo nucleótido
SSCP:	polimorfismo conformacional de cadena sencilla
T ^a :	temperatura
UTR:	región no traducida

Índice

ÍNDICE.....	
1.- INTRODUCCIÓN.....	
1.1.- Neuropatías periféricas hereditarias. Neuropatías sensitivo-motoras hereditarias (NSMH)	2
1.2.- Características y biología del nervio periférico	2
1.3.- Introducción histórica	5
1.4.- Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT)	8
1.4.1.- Aspectos clínicos de la enfermedad de CMT	8
1.4.2.- Aspectos electrofisiológicos de la enfermedad de CMT	10
1.4.3.- Fisiopatología de la enfermedad de CMT	10
1.4.4.- Heterogeneidad genética de la enfermedad de CMT	11
1.4.4.1- Clasificación genética de CMT desmielinizante (CMT1)	13
1.4.4.2- Clasificación genética de CMT axonal (CMT2)	16
1.4.5.- Epidemiología	22
1.5.- Genética de la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth autosómica recesiva	22
1.5.1- Clasificación genética de ARCMT	23
1.5.1.1- Formas desmielinizantes autosómicas recesivas (CMT4)	23
1.5.1.2- Formas axonales autosómicas recesivas (ARCMT2)	28
1.5.2- Genes, mutaciones y mecanismos moleculares	30
1.5.2.1.- Mutaciones puntuales en el gen <i>GDAP1</i>	31
1.5.2.2.- Mutaciones puntuales del gen <i>MTMR2</i> y <i>MTMR13/SBF2</i>	33
1.5.2.3.- Mutaciones puntuales en el gen <i>SH3TC2</i>	34
1.5.2.4.- Mutación ancestral del gen <i>NDRG1</i>	35
1.5.2.5.- Mutaciones puntuales en el gen <i>EGR2</i>	36
1.5.2.6.- Mutaciones en el gen <i>PRX</i>	37
1.5.2.7.- Mutaciones en el gen <i>FGD4</i>	37

1.5.2.8.- Mutaciones puntuales en el gen <i>FIG4</i>	38
1.5.2.9.- Mutación puntual en el gen <i>CTDPI</i>	38
1.5.2.10.- Mutaciones puntuales en el gen <i>LMNA</i>	39
1.5.2.11.- Mutación puntual en el gen <i>MED25</i>	40
1.6.- Identificación de genes asociados a enfermedades humanas	41
1.6.1.- Clonación funcional	41
1.6.2.- Clonación posicional	41
1.6.2.1.- Localización cromosómica	42
1.6.2.1.1.-Análisis de ligamiento	43
1.6.2.1.2.- Cartografiado por homocigosidad	44
1.6.2.1.3.- Genes candidatos	45
1.7.- Búsqueda de mutaciones en genes responsables de enfermedades humanas	45
1.7.1.- Métodos directos de detección de mutaciones	47
1.7.1.1.- Presencia/ausencia de una diana de restricción	47
1.7.1.2.- Empleo de sondas basadas en oligonucleótidos específicos de alelo (ASO)	49
1.7.1.3.- Prueba ARMS: amplificación por PCR basada en cebadores específicos de alelo	50
1.7.1.4.- Ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA)	51
1.7.1.5.- Secuenciación directa del ADN	52
1.7.2.- Métodos indirectos o de cribado de mutaciones	53
1.7.2.1.- Detección de variaciones en el apareamiento entre las cadenas "normal" y mutada	53
1.7.2.2.- Detección de cambios de conformación	54
1.7.2.3.- Detección de productos génicos alterados	56

2.- OBJETIVOS.....	59
3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	
3.1.- Pacientes	61
3.1.1.- Análisis genético del gen <i>GDAP1</i>	61
3.1.2.- Construcción de haplotipos	61
3.1.3.- Análisis genético del gen <i>PMP2</i>	63
3.1.4.- Exclusión del gen <i>GDAP1L1</i> como posible gen candidato	63
3.1.5.- CMT autosómico recesivo en población gitana	64
3.2.- Extracción del ADN	67
3.3.- Análisis de mutaciones en los genes <i>GDAP1</i>, <i>PMP2</i> y <i>GDAP1L1</i>	67
3.3.1.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	67
3.3.2.- SSCPs	69
3.3.3.- Análisis de restricción	70
3.3.4.- Secuenciación de ADN	70
3.4.- Estudio de haplotipos	70
3.5.- Análisis de ligamiento en familias de etnia gitana.	74
3.5.1.- Estudio del locus HMSN-Russe en el cromosoma 10q23	74
3.5.2.- Estudio del locus CMT4C en el cromosoma 5q23-33	77
3.5.3.- Análisis de mutaciones en los genes <i>SH3TC2</i> y <i>NRGD1</i>	79
4.- RESULTADOS.....	
4.1.- Análisis genético del gen <i>GDAP1</i>	83
4.1.1.- Análisis de mutaciones en el gen <i>GDAP1</i>	84
4.1.2.- Modo de herencia mendeliana.	93
4.1.3.- Variabilidad fenotípica	95
4.1.4.- Construcción de haplotipos y efecto fundador	99

4.2.- Análisis de exclusión de genes candidato	112
4.2.1.- Análisis de mutaciones en el gen <i>PMP2</i>	114
4.2.2.- Análisis de mutaciones en el gen <i>GDAP1L1</i>	116
4.3.- Análisis genético y molecular de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth autosómica recesiva en familias de etnia gitana	119
4.3.1.- Estudio de loci conocidos asociados a población gitana con la enfermedad CMT: HMSN-Lom (CMT4D) y HMSN-Russe (CMT4G)	121
4.3.1.1.- Análisis de la mutación p.R148X en el gen <i>NDRG1</i> responsable de la forma HMSN-Lom en el cromosoma 8q24	121
4.3.1.2.- Análisis de segregación mediante el estudio de ligamiento y de haplotipos al locus HMSN-Russe en el cromosoma 10q23	122
4.3.2.- Estudio del locus CMT4C	136
4.3.2.1.- Análisis genético mediante el estudio de ligamiento y de haplotipos al locus CMT4C en el cromosoma 5q23-q33	136
4.3.2.2.- Análisis de mutaciones en el gen <i>SH3TC2</i>	153
5.- DISCUSIÓN.....	
5.1.- Análisis genético del gen <i>GDAP1</i>	163
5.1.1.- Mutaciones en el gen <i>GDAP1</i>	163
5.1.2.- Variabilidad fenotípica en pacientes con mutaciones en el gen <i>GDAP1</i>	166
5.1.3.- Origen de las mutaciones p.Q163X, p.S194X, p.T288fsX3 y efecto fundador	169
5.1.4.- Mutaciones y proteína GDAP1	171

5.2.- Análisis de exclusión de genes candidatos	172
5.3- Análisis genético y molecular de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth autosómica recesiva en familias de etnia gitana	174
5.3.1.- Análisis de exclusión de loci conocidos	175
5.3.1.1.- Locus HMSN-Lom (CMT4D)	176
5.3.1.2.- Locus HMSN-Russe (CMT4G)	177
5.3.2.- Análisis genético en las familias y casos esporádicos excluidos para los loci HMSN-Lom (CMT4D) y HMSN-Russe (CMT4G)	179
5.3.2.1.- Análisis de segregación mediante el estudio de ligamiento y de haplotipos al locus CMT4C en el cromosoma 5q23-q33	180
5.3.2.2.- Mutaciones en el gen <i>SH3TC2</i>	183
5.- CONCLUSIONES.....	188
5.- BIBLIOGRAFÍA.....	192

1.- Introducción

1.1.- NEUROPATÍAS PERIFÉRICAS HEREDITARIAS. NEUROPATÍAS SENSITIVO-MOTORAS HEREDITARIAS (NSMH).

Las neuropatías periféricas hereditarias constituyen uno de los grupos de enfermedades genéticas mendelianas con mayor prevalencia, clínica y genéticamente heterogéneo, afectan a los nervios periféricos produciendo la degeneración progresiva de los mismos. En función de la fisiología de los nervios involucrados se clasifican en, neuropatías sensitivo-motoras hereditarias (NSMH), neuropatías motoras hereditarias (NMH), neuropatías sensitivas hereditarias (NSH), y neuropatías sensitivas y autonómicas hereditarias (NSAH).

Las formas que afectan tanto a los nervios motores como a los sensitivos o NSMH son las más frecuentes, con una prevalencia estimada de 17-40 cada 100.000 habitantes (Martyn y Hughes, 1997). En el conjunto de las neuropatías sensitivo-motoras hereditarias (NSMH) se distinguen cuatro fenotipos clínicos: la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), la neuropatía de Déjérine-Sottas (DS), la neuropatía con hipomielinización congénita (NHC) y la neuropatía con susceptibilidad a la parálisis por presión (NHPP). La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth es de todas las ellas la forma más común de neuropatía periférica hereditaria con una prevalencia de 1 cada 2.500-5.000 habitantes (Combarros *et al.*, 1987; Holmberg, 1993; Lupski *et al.*, 1992; Skre, 1974).

1.2.- CARACTERÍSTICAS Y BIOLOGÍA DEL NERVIO PERIFÉRICO.

La mayoría de los nervios periféricos son mixtos, con axones motores y sensitivos recubiertos en toda su longitud por células de Schwann (Fig.1). Durante el desarrollo, los precursores de las células de Schwann migran desde la cresta neural y contactan con los axones en desarrollo. Estas células de Schwann inmaduras invaden y cubren los haces de axones en desarrollo estableciendo algunas de ellas una relación 1:1, proceso llamado “etapa de mielinización”, iniciándose entonces un programa de expresión de los genes específicos de la

mielina y diferenciándose en células de Schwann mielinizantes y células de Schwann no mielinizantes.

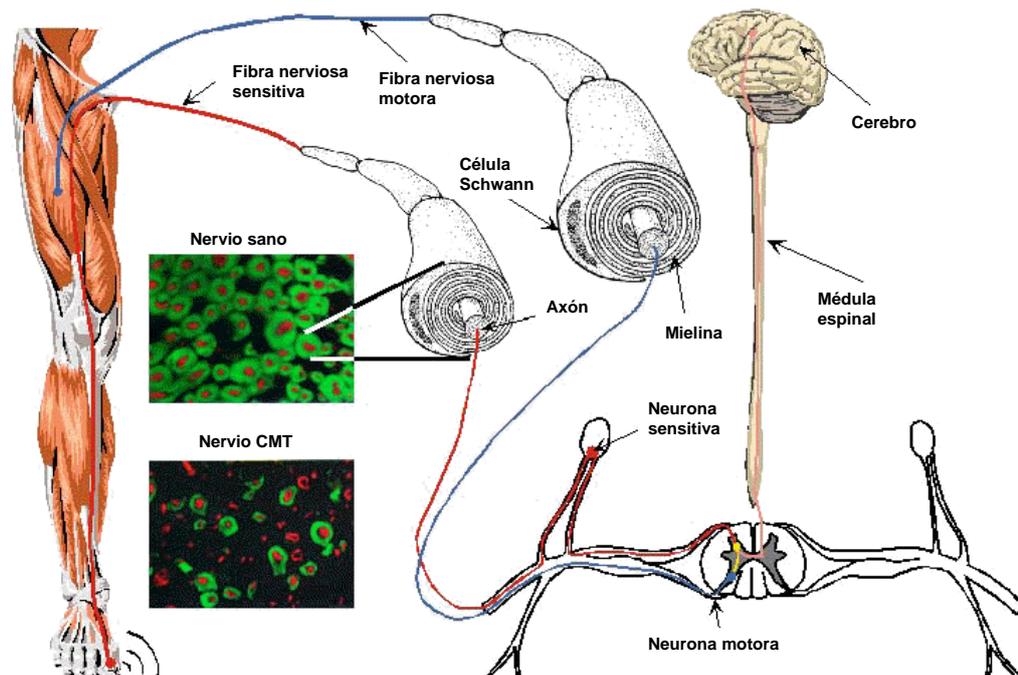


Figura 1. Dibujo donde se muestra la biología del nervio periférico y su implicación en las neuropatías periféricas.

La función principal de la mielina es aumentar la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos permitiendo la rápida conducción saltatoria entre regiones excitables del axón llamadas nodos de Ranvier, en los cuales el axón se encuentra casi al descubierto y sólo aparece revestido por pequeñas prolongaciones interdigitadas procedentes de los bordes de dos células de Schwann adyacentes (Fig.2). Tanto los axones mielinizados como los nodos de Ranvier son muy complejos estructuralmente.

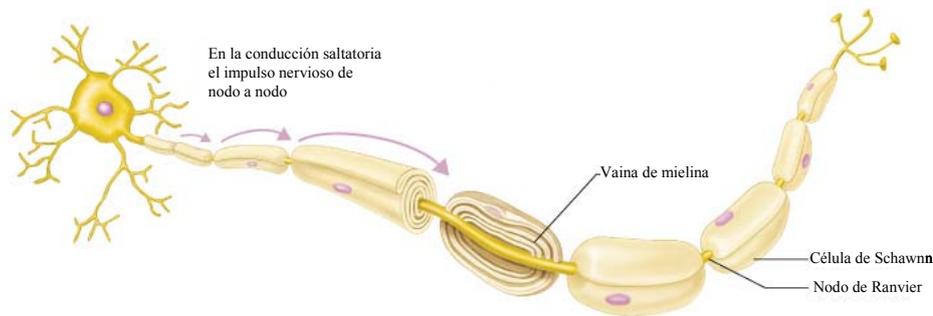


Figura 2.- Dibujo de una neurona donde se puede observar la conducción saltatoria a lo largo del axón de nodo a nodo.

La vaina de mielina está compuesta por dos regiones distintas, la mielina compacta y la mielina no compacta, cada una de las cuales está constituida por unas proteínas específicas. La región compacta está formada por proteínas estructurales, proteína de la mielina periférica 22 (PMP22), proteína cero de la mielina (P_0), y proteína básica de la mielina (MBP), necesarias para la formación de la vaina de mielina altamente organizada y para el aislamiento eléctrico del axón. La región no compacta contiene las siguientes proteínas: neurofacina 155, conexina 32 (Cx32), proteína asociada a la mielina (MAG) y E-cadherina, las cuales participan en las interacciones célula de Schwann-axón, célula de Schwann-célula de Schwann, y son requeridas para la formación de las estructuras paranodales y juxtapanodales, así como para las uniones adherentes y uniones axo-gliales. También existen proteínas específicas de la superficie axonal, como son los canales de sodio y potasio involucrados directamente en la conducción saltatoria.

El proceso de desarrollo del nervio periférico asociado con la diferenciación de las células de Schwann, la mielinización y el aislamiento eléctrico del nodo de Ranvier da una idea acerca de la patogénesis de las

neuropatías periféricas, ya que éstas son producidas por mutaciones en genes que alteran aspectos cruciales de este proceso biológico en células de Schwann o en el axón, como puede ser la compactación de la mielina o la formación de las uniones axo-gliales.

1.3- INTRODUCCIÓN HISTÓRICA

La enfermedad de Charcot Marie Tooth fue descrita en 1886 por Charcot y Marie en Francia y por Tooth en Inglaterra quienes simultáneamente identificaron con detalle una nueva forma de atrofia muscular progresiva que denominaron "atrofia muscular peroneal", lo que hoy conocemos por síndrome de Charcot-Marie-Tooth (Charcot y Marie, 1886; Tooth, 1886). La enfermedad tenía un carácter familiar cuyos síntomas comenzaban en la infancia con debilidad y atrofia de la musculatura peroneal y la progresión era lenta.

Pocos años después, Déjérine y Sottás describieron una neuropatía de comienzo en la infancia, con importantes atrofas distales, alteraciones sensitivas de la coordinación y nervios hipertróficos (Déjérine y Sottás, 1893). En 1926, Roussy y Lévy publicaron las características clínicas de siete miembros de una familia con veinte afectos, cuyo síndrome clínico era similar al descrito por Charcot, Marie y Tooth, salvo que la atrofia no existía o era mínima, la sensibilidad era normal y los pacientes mostraron un temblor al ejecutar los movimientos (Roussy y Lévy, 1926).

En las siguientes décadas, la descripción de variantes clínicas condujo a una gran confusión nosológica, como lo demuestra el hecho de que Davidenkow en 1927 fuera capaz de describir doce formas clínico-genéticas (Davidenkow, 1927). En todo caso, éste es un periodo fructífero en el cual se delimitan ciertos patrones de herencia (dominante o recesiva) y el sustrato neuropatológico de la neuropatía (desmielinizante o axonal).

Gilliatt y Thomas (Gilliatt y Thomas, 1957), y Dick y Lambert (Dick y Lambert, 1968a) en los años 1957 y 1968 respectivamente, fueron los primeros en observar que los estudios electrofisiológicos mostraban una disminución en la velocidad de conducción nerviosa en algunas familias con neuropatía hereditaria, mientras que en otras familias se mantenían los valores normales, sugiriendo la existencia de dos formas clínicas de neuropatía en la atrofia muscular peroneal. Dick y Lambert (1968a, 1968b), y Thomas y Harding (Thomas *et al.*, 1974; Thomas y Harding, 1980) contribuyeron enormemente en la clasificación de las neuropatías en la atrofia muscular peroneal en base a los patrones de herencia, características clínicas, electrofisiológicas y patológicas. Introdujeron el término de neuropatía sensitivo-motora hereditaria (NSMH), diferenciando tres formas, NSMH tipo I, NSMH tipo II y NSMH tipo III. Denominaron neuropatía sensitivo-motora hereditaria tipo I (NSMH I), a la forma hipertrófica autosómica dominante caracterizada por un descenso de las velocidades de conducción nerviosa motora periférica, y en la que observaron procesos de desmielinización y remielinización en los nervios periféricos, y la neuropatía sensitivo-motora hereditaria tipo II (NSMH II), a la forma neuronal autosómica dominante con velocidades de conducción nerviosa periférica normales o ligeramente reducidas, en las cuales la patología del nervio mostraba procesos de degeneración axonal y regeneración. Los casos de herencia recesiva o esporádicos semejantes al tipo I, pero más agresivos los denominaron enfermedad de DeJérine Sottás o neuropatía hereditaria motora y sensitiva tipo 3 (NSMH III). Con el advenimiento de la era molecular, el acrónimo NSMH fue sustituido en la literatura por el epónimo de la enfermedad de CMT. Así, la forma desmielinizante o tipo 1 de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT1) se correspondía con NSMH tipo I y la forma axonal o tipo 2 (CMT2) con NSMH tipo II.

En 1982, Bird y sus colaboradores (Bird *et al.*, 1982), en uno de los primeros estudios de ligamiento que se hicieron en enfermedades neurológicas, demostraron que el gen que producía la forma CMT1 autosómica dominante, se encontraba ligado al locus del antígeno Duffy en el cromosoma 1. Sin embargo, había familias no ligadas al cromosoma 1 y que, en posteriores estudios, mostraban ligamiento en el brazo corto del cromosoma 17 (Vance *et al.*, 1989). Estas eran las más frecuentes. El locus del cromosoma 17p se denominó CMT1A mientras que el locus del cromosoma 1q se denominó CMT1B. Por otra parte, se observó que algunas familias con herencia autosómica dominante no estaban ligadas a los loci CMT1A y CMT1B, hablándose de un tercer locus CMT1C (Street *et al.*, 2002). En 1989 se determinó que la clásica familia norteamericana descrita por Allan en 1932 realmente tenía un patrón ligado al cromosoma X y fue confirmada mediante análisis de ligamiento (Haites *et al.*, 1989). Este locus se ha denominado CMTX.

En los últimos 15 años, debido al desarrollo de la genética molecular, biología molecular y celular, ha permitido la localización de más de 40 loci cromosómicos relacionados con las neuropatías periféricas hereditarias. Con el reciente avance del *Proyecto del Genoma Humano* el número de genes identificados causantes de las neuropatías periféricas hereditarias ha incrementado considerablemente, estableciéndose actualmente en 40 genes, siendo los más numerosos los que se asocian con neuropatías sensitivo-motoras o enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (De Jonghe *et al.*, 1997; Palau *et al.*, 2002; <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations>).

1.4.- ENFERMEDAD DE CHARCOT-MARIE-TOOTH (CMT)

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth representa a un grupo de entidades clínica y genéticamente heterogéneo, siendo la forma más común de neuropatía periférica hereditaria, con una prevalencia estimada en 1 cada 2.500-5.000 habitantes (Combarros *et al.*, 1987; Holmberg *et al.*, 1997; Lupski *et al.*, 1992; Skre, 1974), como ya mencionamos anteriormente. Clínicamente se caracteriza por la presencia de déficit preferentemente motor y en menor grado sensitivo, de distribución distal y carácter progresivo, y con un comienzo en los miembros inferiores y eventual posterior afectación de los superiores. En base a criterios electrofisiológicos e histopatológicos la neuropatía CMT se clasifica en dos grandes grupos: las formas desmielinizantes o CMT1 que afectan primariamente a la mielina, y las formas axonales o CMT2 en las que la lesión primaria está en el axón neuronal. Las formas CMT1 se reconocen por presentar velocidades de conducción nerviosa (VCN) disminuidas y procesos de desmielinización y remielinización en la biopsia del nervio. Por el contrario, en las formas CMT2 las velocidades de conducción nerviosa son normales o ligeramente reducidas y presentan una pérdida importante del número de axones en los cortes histológicos.

1.4.1.- Aspectos clínicos de la enfermedad de CMT

Como ya hemos mencionado anteriormente, la enfermedad de CMT representa a un grupo de entidades clínicamente heterogéneo, de hecho existe un amplio rango de variabilidad en la presentación clínica y gravedad de la enfermedad, no sólo entre individuos no relacionados entre sí (Dyck y Lambert, 1968; García CA., 1999), sino también entre miembros de una misma familia (Lupski *et al.*, 2000), e incluso entre gemelos (Dyck *et al.*, 1993; Adams *et al.*, 1999). Esta variabilidad se genera principalmente por las diferencias en las edades de aparición de la enfermedad, gravedad de las zonas afectadas y la velocidad de progresión de la sintomatología (García CA, 1999).

Los síntomas de la enfermedad se inician generalmente en la primera y segunda década de vida. Es la debilidad bilateral y simétricamente progresiva de los músculos distales de las extremidades su característica inicial. Esta comienza por los pies y piernas, y conlleva cambios evidentes en la forma de caminar (Adams *et al.*, 1999; García CA, 1999; Lupski *et al.*, 2000). A medida que progresa la enfermedad, la atrofia de la musculatura peroneal se intensifica afectando a toda la pierna e incluso pudiendo llegar hasta el tercio inferior del muslo, aspecto que ha sido denominado en la literatura como “patas de cigüeña o botella de champagne invertida” (Fig.3). Estos cambios del volumen muscular no son exclusivos de las piernas, sino que en etapas más avanzadas de la enfermedad, en algunos casos, pueden afectar a los músculos intrínsecos de las manos y del tercio distal del antebrazo. Las deformidades esqueléticas son también síntomas y signos llamativos, siendo el pie cavo, los dedos en martillo y la escoliosis los más constantes (fig.3). Los síntomas sensitivos son menos frecuentes, aunque la sensibilidad para la vibración suele estar disminuida (Adams *et al.*, 1999; García CA, 1999; Lupski *et al.*, 2000).



Figura 3.- Características clínicas de la enfermedad de CMT. A , B. Muestran las deformidades típicas de los pies: pies cavos, dedos en martillo. C, D. Muestran las deformidades en las manos que suelen afectar a los casos más graves. E, F. Muestra el fenotipo conocido como “botella de champagne invertida”.

1.4.2.- Aspectos electrofisiológicos de la enfermedad de CMT

El criterio fundamental que ha permitido la división de CMT en tipos 1 y 2 es el valor divisorio de la velocidad de conducción nerviosa motora (VCM) situado en 38 m/s (Dyck y Lambert, 1968; Harding y Thomas, 1980). CMT1, se caracteriza por presentar velocidades de conducción nerviosa reducidas (<38 m/s) y una mielinopatía primaria; por otro lado, CMT2 presenta velocidades de conducción nerviosa normales o ligeramente reducidas (>38 m/s) afectando primariamente al axón (Harding y Thomas., 1980). La aparición de un subgrupo de CMT que muestra velocidades de conducción “intermedias” entre CMT1 y CMT2 ha sido motivo de grandes discusiones (Humberston, 1972; Salisachs, 1974; Brust *et al.*, 1978; Davis *et al.*, 1978). Recientemente, se han identificado cuatro formas de CMT intermedia con herencia autosómica dominante (DI-CMT) que apoyan la existencia de este subgrupo (Villanova *et al.*, 1998; Verhoeven *et al.*, 2001; Jordanova *et al.*, 2003b; Züchner *et al.*, 2005).

Los estudios de las VCN permiten evaluar la presencia, el grado y los patrones de conducción de los nervios motores y sensitivos implicados en la neuropatía de CMT. Una disminución en la VCN proporciona evidencias indirectas de una disfunción en la mielina generalmente considerado como un signo de desmielinización o hipomielinización, aunque también puede deberse a otros mecanismos (Capasso *et al.*, 2004). El grado del daño axonal y pérdida de fibras se reflejan en una disminución en el potencial de acción compuesto motor (CMAP) y en el potencial de acción sensitivo (SNAP) en los nervios motores y sensitivos, respectivamente.

1.4.3.- Fisiopatología de la enfermedad de CMT

La biopsia del nervio ha permitido distinguir fisiopatológicamente la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth en dos formas: desmielinizante o CMT1 y axonal o CMT2.

En las formas desmielinizantes o CMT1, las biopsias del nervio sural ponen de manifiesto una pérdida de fibras mielinizadas, des-remielinización segmentaria y proliferación de las células de Schwann en “bulbo de cebolla” (fig.4). La pérdida de axones mielinizados justifica la semiología polineuropática, la proliferación de las células de Schwann y el engrosamiento de los nervios. La disminución de la VCN se correlaciona con los fenómenos desmielinizantes.

En las formas axonales o CMT2, la biopsia del nervio sural demuestra la pérdida de fibras mielínicas gruesas y clusters de regeneración con aumento del número de fibras mielínicas finas. Las fibras existentes presentan fenómenos de atrofia axonal y ocasionales cúmulos intraaxonales de neurofilamentos (Thomas *et al.*, 1996), la presencia de desmielinización es muy rara y no se observan bulbos de cebolla (Fig.4).

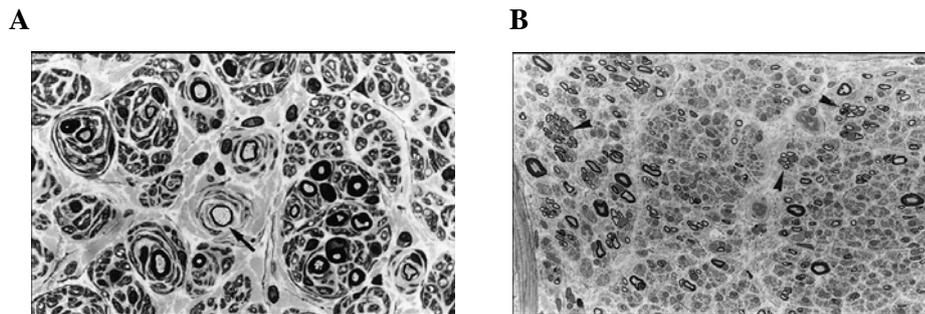


Figura 4.- *A: corte semifino del nervio sural en un paciente con CMT1A (desmielinizante). Se observa pérdida de fibras mielinizadas, fibras des-remielinizadas (indicado con la flecha) y formaciones en bulbo de cebolla. B: sección semifina del nervio ciático en un paciente con CMT2 (axonal). Se aprecia la acusada pérdida de fibras mielínicas gruesas y la presencia de racimos de fibras en regeneración (indicadas con puntas de flecha).*

1.4.4.- Heterogeneidad genética de la enfermedad de CMT

La neuropatía de CMT representa a un grupo de entidades genéticamente heterogéneo que exhibe distintas formas de herencia mendeliana, autosómica dominante, autosómica recesiva y ligada al X, tanto en su forma desmielinizante (CMT1) como en su forma axonal (CMT2).

Introducción

Generalmente se transmite de modo autosómico dominante, siendo el subtipo autosómico dominante CMT1A el más frecuente, constituyendo alrededor del 70% de los pacientes con CMT (Nelis *et al.*, 1996). En el 10% de los pacientes con CMT el modo de herencia es ligada al X (Dubourg *et al.*, 2001a; Boerkoel *et al.*, 2002), mientras que las formas autosómicas recesivas son menos frecuentes constituyendo el 4% de la población europea (Dubourg *et al.*, 2001). Sin embargo, en poblaciones con un elevado porcentaje de matrimonios consanguíneos la enfermedad de CMT autosómica recesiva (AR-CMT) aumenta su frecuencia al 30-50% (Martin *et al.*, 1999). En función del patrón de herencia, y de las alteraciones genético-moleculares encontradas, es posible clasificar la enfermedad de CMT desmielinizante y CMT axonal en varios subgrupos (Tabla 1, Tabla 2, Tabla 3 y Tabla 4).

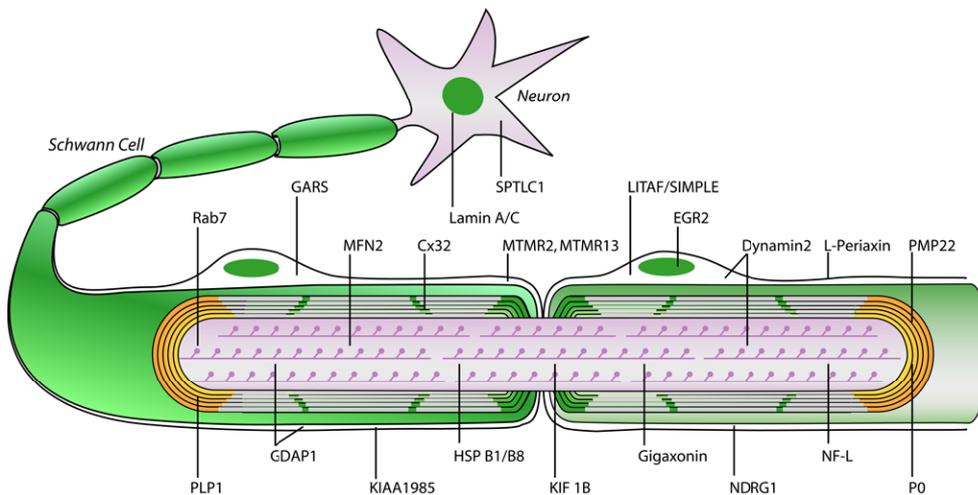


Figura 5.- Descripción esquemática de las proteínas en las que mutaciones en su secuencia génica causan la neuropatía de CMT. En esta figura se muestra la localización de cada una de las proteínas asignadas a la célula de Schwann y/o neurona.

1.4.4.1.- Clasificación genética de CMT desmielinizante (CMT1)

La forma CMT1 se puede subdividir en varios subgrupos en función del patrón de herencia: autosómico dominante (AD CMT1) y autosómico recesivo (CMT4).

Las neuropatías CMT1 autosómicas dominantes son las formas más frecuentes. Los estudios de cartografiado genético mediante ligamiento han permitido identificar cinco loci asociados a esta forma: CMT1A, CMT1B, CMT1C, CMT1D y CMT1F. CMT1A fue identificado en la región cromosómica 17p11.2 (Vance *et al.*, 1989) y es el subtipo autosómico dominante más frecuente, causado mayoritariamente por la duplicación de 1.5Mb en el cromosoma 17p11.2 que engloba el gen de la proteína de la mielina *PMP22* o en menor frecuencia por la presencia de mutaciones puntuales en el gen *PMP22*; CMT1B identificado en el cromosoma 1q22-q23 (Bird *et al.*, 1982), es menos frecuente que el subtipo CMT1A y está causado por la presencia de mutaciones en el gen *MPZ* que suponen menos del 5% de los enfermos con fenotipo CMT1 (Nelis *et al.*, 1996). Los subtipos CMT1C y CMT1D se han cartografiado en los loci genéticos 16p13.1 (Street *et al.*, 2002) y 10q21-q22 (Warner *et al.*, 1998) respectivamente, y descrito mutaciones, en el gen *LITAF/SIMPLE* como el causante de CMT1C (Street *et al.*, 2003; Bennett *et al.*, 2004; Saifi *et al.*, 2005) y en el gen *EGR2* como causante de la forma CMT1D. El subtipo CMT1F descrito recientemente (De Jonghe *et al.*, 2001; Jordanova *et al.*, 2003), está causado por mutaciones en el gen *NEFL*, originariamente descrito como causante del fenotipo axonal autosómico dominante CMT2E. Las características de esta forma AD CMT1 quedan esquematizadas en la tabla 1.

La neuropatía CMT1 autosómica recesiva, denominada CMT4, está causada por mutaciones puntuales en los genes, *GDAP1* (CMT4A), *MTMR2* (CMT4B1), *MTMR13/SBF2* (CMT4B2), *SH3TC2* (CMT4C), *NDRG1* (CMT4D), *EGR2* (CMT4E), *PRX* (CMT4F), *FGD4* (CMT4H), *FIG4* (CMT4J) y *CTDP1*

Introducción

(CCFDN); Además, se ha identificado un locus genómico asociado a esta forma autosómica recesiva, CMT4G (HMSN-Russe), de la que todavía no se conoce el gen responsable (Tabla 1.-Continuación). La información genética de esta forma desmielinizante con herencia autosómica recesiva se ampliará en el apartado 1.5.

Tabla 1.- Formas desmielinizantes de la neuropatía de CMT.

Formas desmielinizantes autosómicas dominantes (AD CMT1)

Gen/Locus	Localización cromosómica	Fenotipo (OMIM)	Localización celular de la proteína y función	Referencias
<i>PMP22</i>	17p11.2	CMT1A (118220)	Mielina compacta: mantenimiento de la estructura	(Snipes <i>et al.</i> , 1992 ; Naef y Suter <i>et al.</i> , 1999)
<i>MPZ</i>	1q22-q23	CMT1B (118200)	Mielina compacta: Mantenimiento de la estructura	(Filbin <i>et al.</i> , 1999)
<i>LITAF/SIMPLE</i>	16p13.1	CMT1C (607736)	Citoplasma célula de Schwann: Degradación de proteínas	(Moriwaki <i>et al.</i> , 2001)
<i>EGR2</i>	10q21-q22	CMT1D (607678)	Núcleo célula de Schwann : induce la expresión de proteínas para el mantenimiento de la mielina	(Topilko <i>et al.</i> , 1994)
<i>NEFL</i>	8p21	CMT1F (607734)	Citoesqueleto de neuronas : andamiaje axonal	(Lariviere and Julien, 2004)

AD CMT1, neuropatía de Charcot-Marie-Tooth desmielinizante autosómica dominante ; PMP22, peripheral myelin protein 22 gene ; MPZ, myelin protein zero gene ; LITAF/SIMPLE, lipopolysaccharide-induced TNF factor gene/small integral membrane protein of lysosome/late endosome ; EGR2, early growth response 2 gene ; NEFL, neurofilament protein light polypeptide gene ; GJB1/Cx32, gap junction protein B1/ connexin 32.OMIM: base de datos cuyas siglas en inglés son, Online Mendelian Inheritance in Man.

Tabla 1 (Continuación).- Formas desmielinizantes de la neuropatía de CMT.

Formas desmielinizantes autosómicas recesivas (CMT4)

Gen/Locus	Localización cromosómica	Fenotipo (OMIM)	Localización celular de la proteína y función	Referencias
<i>GDAP1</i>	8q13-q21	CMT4A (214400)	Membrana mitocondrial externa: posible regulación de la red mitocondrial	(Niemann <i>et al.</i> , 2005; Pedrola <i>et al.</i> , 2005)
<i>MTMR2</i>	11q22	CMT4B1 (601382)	Citoplasma célula de Schwann: interviene en la transcripción génica	(Laporte <i>et al.</i> , 1996; Bolino <i>et al.</i> , 2000)
<i>MTMR13/SBF2</i>	11p15	CMT4B2 (604563)	Citoplasma célula de Schwann: proteína de señalización celular	Azzedine <i>et al.</i> , 2003; Senderek <i>et al.</i> , 2003b)
<i>KIAA1985/SH3TC2</i>	5q23-q33	CMT4C (601596)	Proteína y función desconocida	(Senderek <i>et al.</i> , 2003a)
<i>NDRG1</i>	8q24	CMT4D (601455)	Parece intervenir en el mantenimiento de la vaina de mielina.	(Berger <i>et al.</i> , 2004)
<i>EGR2</i>	10q21.1-q22.1	CMT4E (605253)	Factor de transcripción, factor clave en la mielinización	(Nagarajan <i>et al.</i> , 2001; Parkinson <i>et al.</i> , 2004; Le <i>et al.</i> , 2005a; Leblanc <i>et al.</i> , 2005)
<i>PRX</i>	19q	CMT4F (145900)	Cambia de localización de la membrana adaxonal a la membrana abaxonal, mantenimiento de la mielina	(Dytrych <i>et al.</i> , 1998; Straub <i>et al.</i> , 2003)
<i>CTPDI</i>	18q23-qter	CCFDN (604168)	Componente esencial de la maquinaria transcripcional	(Varon <i>et al.</i> , 2003)
<i>Locus 10q23</i>		CMT4G (HMSN-Russe) (605285)	Desconocido	(Rogers <i>et al.</i> , 2000; Thomas <i>et al.</i> , 2001)
<i>FGD4</i>	12p11.1-q13.11	CMT4H (609311)	Desconocido	(De Sandre-Giovannoli <i>et al.</i> , 2005; Stendel <i>et al.</i> , 2007; Delague <i>et al.</i> , 2007)
<i>FIG4</i>	6q21	CMT4J (611228)	Desconocido	Chow <i>et al.</i> , 2007

GDAP1, ganglioside-induced differentiation-associated protein 1; *MTMR2*, myotubularin-related protein 2; *MTMR13/SBF2*, myotubularin-associated protein 13/SET binding factor 2; *KIAA1985*, desconocido; *NDRG1*, N-myc downregulated gene1; *EGR2*, Early growth factor 2; *PRX*, periaxin; *CTPDI*, FCP1 protein phosphatase. *FGDA*, Frabin; *FIG4*, Desconocido; *OMIM*: Online Mendelian Inheritance in Man (base de datos).

1.4.4.2.- Clasificación genética de CMT axonal (CMT2)

Al igual que las neuropatías CMT desmielinizantes, las neuropatías de CMT axonales pueden subdividirse en función del patrón de herencia en: autosómicas dominantes (CMT2), autosómicas recesivas (ARCMT2). La prevalencia de las formas axonales de CMT es mucho menor que la estimada para las formas desmielinizantes representada en un tercio de todos los pacientes CMT (Harding y Thomas, 1980).

Se han descrito ocho genes causantes de las formas axonales de CMT autosómica dominante, seis de ellos conocidos por causar primariamente CMT axonal autosómico dominante: *MFN2* (CMT2A), *RAB7* (CMT2B), *GARS* (CMT2D), *NEFL* (CMT2E), *HSP27* (CMT2F) y *HSP22* (CMT2L), y los otros dos descritos inicialmente como responsables de otros tipos de CMT: *MPZ* (CMT2J y CMT2I) y *GDAP1* (CMT2K) (Tabla1, Fig.5). El locus CMT2A fue el primer locus cartografiado de neuropatía axonal, localizado en la región cromosómica 1p36 (Ben Othmane *et al.*, 1993). Se identificaron dos genes como causantes de la enfermedad. El primero de ellos, el gen *KIF1B*, fue identificado tras la detección de una única mutación en una única familia japonesa (Zhao *et al.*, 2001) y posteriormente, fue identificado el gen *MFN2* como la causa subyacente en el resto de familias CMT2A descritas hasta el momento (Zuchner *et al.* 2004a), siendo la forma más prevalente de CMT axonal, representando al 20% de pacientes con CMT2 (Zuchner *et al.*, 2004a; Kijima *et al.*, 2005; Lawson *et al.*, 2005). Recientemente, mutaciones en el gen *MFN2* también han sido identificadas en otras enfermedades inicialmente descritas como HMSN V (Zuchner *et al.*, 2004a) y HMSN VI (Zuchner *et al.*, 2004a; Chung *et al.*, 2006). Dado que únicamente se ha descrito una única variación en el gen *KIF1B*, el consortium internacional de CMT (Second Symposium of the North American CMT Consortium, 2005, University of Western Ontario, Canada) ha sugerido que dicho gen (*KIF1B*) no debe ser considerado como un candidato para la etiología de CMT2 hasta que no se describan nuevas mutaciones. La forma CMT2E cartografiada en la región

cromosómica 8p21, está causada por la presencia de mutaciones en el gen *NEFL* (Mersiyanova *et al.*, 2000), siendo la segunda forma más prevalente de las neuropatías CMT2 (Jordanova *et al.*, 2003). La forma CMT2B se localiza en el locus cromosómico 3q21, y está causada por la presencia de mutaciones en el gen *RAB7* (Verhoeven *et al.*, 2003); debido a sus características fenotípicas preferentemente sensitivas, según algunos autores esta forma debería ser considerada dentro del grupo de las neuropatías sensitivas y autonómicas hereditarias (NSAH) (Vance *et al.*, 1996; Auer-Grumbach, 2004; Houlden *et al.*, 2004). La forma CMT2D fue localizada en el locus cromosómico 7p15 y está causada por la presencia de mutaciones en el gen *GARS*, gen donde también se han descrito mutaciones en la distrofia muscular espinal distal tipo V (dSMA V) (Antonellis *et al.*, 2003). Las formas CMT2F y CMT2L, cartografiadas en los loci cromosómicos 7q11-q21 y 12q24.3, respectivamente, están causadas por mutaciones en los genes *HSP27* y *HSP22*, respectivamente. Ambas proteínas han sido descritas como causantes no sólo de estas formas axonales de CMT (CMT2F y CMT2L) sino también de la neuropatía motora hereditaria (NMH) (Evgrafov *et al.*, 2004; Irobi *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2004). Además, cabe destacar que el fenotipo axonal con herencia autosómica dominante también puede estar causado por mutaciones puntuales en genes que ya se habían identificado como responsables de formas desmielinizantes: *MPZ* (CMT2I y CMT2J) (Senderek *et al.*, 1999; De Jonghe *et al.*, 1999) y *GDAP1* (CMT2H y CMT2K) (Barhoumi *et al.*, 2001; Claramunt *et al.*, 2005). Por otro lado, a pesar de la reciente identificación de estos genes al menos dos loci genómicos están por resolver, CMT2C cartografiado en el locus 12q23-q24 y CMT2G en 12q12-q13.3. Las características de esta forma AD CMT2 quedan esquematizadas en la tabla 2.

La forma autosómica recesiva (AR CMT2), está causada por mutaciones en los genes *LMNA*, *GDAP1* y *MED25*, cuya información genética será ampliada en el apartado 1.5 (Tabla 2.- Continuación).

Tabla 2.- Formas axonales de la neuropatía de CMT

Formas axonales autosómicas dominantes (AD CMT2 o CMT2)

Gen/Locus	Localización cromosómica	Fenotipo (OMIM)	Localización celular de la proteína y función	Referencias
<i>MNF2</i>	1p36.2	CMT2A (609260)	Parece intervenir en el proceso de fusión en la membrana mitocondrial	(Rojo <i>et al.</i> , 2002; Chen and Chan, 2004)
<i>RAB7</i>	3q21	CMT2B (600882)	Endosomas tardíos, transporte endosomal	(Feng <i>et al.</i> , 1995; Meresse <i>et al.</i> , 1995)
<i>GARS</i>	7p15	CMT2D (601472)	Procesamiento tRNA	(Shiba <i>et al.</i> , 1994).
<i>NEFL</i>	8p21	CMT2E (607684)	Filamentos intermedios neuronales, citoesqueleto neuronal	(Pérez-Ollé <i>et al.</i> , 2005)
<i>HSP27</i>	7q11-21	CMT2F (606595)	Proteína chaperona mitocondria, estabilidad del potencial de la membrana mitocondrial	(Preville <i>et al.</i> , 1999 ; Irobi <i>et al.</i> , 2004; Carra <i>et al.</i> , 2005).
<i>GDAP1</i>	8q13-q21.1	CMT2H (607731) CMT2K (607831)	Membrana mitocondrial externa: posible regulación de la red mitocondrial	(Niemann <i>et al.</i> , 2005; Pedrola <i>et al.</i> , 2005)
<i>MPZ</i>	1q22	CMT2I (607677) CMT2J (607736)	Mielina compacta : Mantenimiento de la estructura	(Filbin <i>et al.</i> , 1999)
<i>HSP22</i>	12q24.3	CMT2L (608673)	Proteína chaperona mitocondria, estabilidad del potencial de la membrana mitocondrial	(Preville <i>et al.</i> , 1999 ; Irobi <i>et al.</i> , 2004; Carra <i>et al.</i> , 2005).
<i>Locus 12q23</i>		CMT2C (606071)	Desconocido	(Klein <i>et al.</i> 2003)
<i>Locus 12q13</i>		CMT2G (608591)	Desconocido	(Nelis <i>et al.</i> , 2004).

MFN2, mitofusin 2; *RAB7*, RAS-associated protein 7; *GARS*, glycyl-tRNA synthetase; *NEFL*, neurofilament light ; *HSP27*, heat-shock protein 27; *GDAP1*, ganglioside-induced differentiation-associated protein 1; *MPZ*, myelin protein zero gene ; *HSP22*, heat-shock protein 22. OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man.

Tabla 2 (Continuación).- Formas axonales de la neuropatía de CMT**Formas axonales autosómicas recesivas (ARCMT2)**

Gen/Locus	Localización cromosómica	Fenotipo (OMIM)	Localización celular de la proteína y función	Referencias
<i>LMNA</i>	1q21.2	ARCMT2A/CMT2B1 (605588)	Núcleo Célula Schwann, interacción con otras moléculas y estabilidad del genoma	(Bouhouche <i>et al.</i> , 1999 ; De Sandre-Giovannoli <i>et al.</i> , 2002)
<i>MED25</i>	19q13.3	ARCMT2B/CMT2B2	Desconocida	(Leal <i>et al.</i> , 2001; Rautenstrauss <i>et al.</i> , 2005a)
<i>GDAP1</i>	8q13-q21.1	*CMT2+VCP, AR (CMT4A) (607706) CMT2H (607731) CMT2K (AR) (607831)	Membrana mitocondrial externa: posible regulación de la red mitocondrial	(Niemann <i>et al.</i> , 2005; Pedrola <i>et al.</i> , 2005)

* Aunque CMT4A generalmente se refiere a las formas desmielinizantes, también se ha utilizado en ocasiones para designar a las formas axonales recesivas, sin embargo según algunos autores y la base de datos OMIM debería designarse a la forma autosómica recesiva axonal causada por mutaciones en el gen *GDAP1* como CMT2+VCP. *LMNA*, A-type lamins; *MED25*, mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 25 homolog; *GDAP1*, ganglioside-induced differentiation-associated protein 1. OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man.

La neuropatía de CMT ligada al X puede clasificarse según el patrón de herencia en formas dominantes o recesivas. Se han descrito tanto formas desmielinizantes (CMT1X y CMT5X), axonales (CMT4X) como ambas (CMT2X y CMT3X) (Tabla 3).

La neuropatía CMT dominante ligada al X (CMT1X), es la segunda forma más común de las neuropatías sensitivo-motoras hereditarias. Una mutación puntual en la conexina 32 o *GJB1* da lugar a esta forma dominante ligada al cromosoma X (CMT1X). El locus genético de la enfermedad CMT1X fue cartografiado en el cromosoma Xq13.1 (Mostacciolo *et al.*, 1991; Ionasescu *et al.*,

Introducción

1992; Bergoffen *et al.*, 1993; Fain *et al.*, 1994; Le Guern *et al.*, 1994). Estudios electrofisiológicos y patológicos de los nervios periféricos realizados en pacientes CMT1X muestran evidencias de desmielinización y degeneración axonal prominente. El análisis de mutaciones en un gran número de familias CMT de diferentes poblaciones demuestran que CMT1X es la segunda forma CMT desmielinizante más común, con una frecuencia del 7-11% de entre todos los pacientes CMT (Silander *et al.*, 1998; Mersiyanova *et al.*, 2000; Mostacciolo *et al.*, 2001; Boerkoel *et al.*, 2002; Numakura *et al.*, 2002).

Se han descrito 4 loci asociados con formas recesivas de CMT ligado al cromosoma X: CMT2X, CMT3X, CMT4X y CMT5X. Las formas CMT2X y CMT3X han sido cartografiadas en dos loci diferentes, Xp22 y Xq26, respectivamente (Ionasescu *et al.*, 1991 y 1992; Huttner *et al.*, 2006). Los estudios electrofisiológicos realizados en estos pacientes muestran que son formas tanto desmielinizantes como axonales. CMT4X, se ha cartografiado en el locus cromosómico Xq24-q26.1 (Cowchock *et al.*, 1985; Fischbeck *et al.*, 1986) y se ha descrito como una forma axonal (Sladky *et al.*, 1984; Cowchock *et al.*, 1985; Fischbeck *et al.*, 1987; Priest *et al.*, 1995). La forma CMT5X, que puede heredarse de forma dominante o recesiva, se ha cartografiado en el cromosoma Xq21-q24 (Kim *et al.*, 2005) y está causada por mutaciones en el gen *PRPS1* (Kim *et al.*, 2007).

La neuropatía de CMT “intermedia” es considerada por algunos autores (Madrid *et al.*, 1977; Davis *et al.*, 1978) como un grupo neuronal genéticamente distinto a las formas desmielinizantes (CMT1) y axonales (CMT2) (Tabla 4). Se han identificado cuatro loci DI-CMT: DI-CMTA, localizado en la región cromosómica 10q24.1-q25.1 (Verhoeven, *et al.*, 2001); DI-CMTB, cartografiado en la región cromosómica 19p13-12 (Zuchner *et al.*, 2005) y está causado por la presencia de mutaciones en el gen *dynamin2 gene (DNM2)*; DI-CMTC, se ha cartografiado en la región cromosómica 1p35-p34 (Jordanova *et al.*, 2003b) y está

causado por la presencia de mutaciones en el gen *YARS* (Jordanova *et al.*, 2006); DI-CMTD, localizado en el locus cromosómico 1q22 está causado por la presencia de mutaciones en el gen *MPZ* (Mastaglia *et al.*, 1999).

Tabla 3.- Formas ligadas al cromosoma X de la neuropatía de CMT.

Gen/Locus	Localización cromosómica	Fenotipo (OMIM)	Criterios Electrofisiológicos	Herencia
<i>GJB1/Cx32</i>	Xq13.1	CMT1X (302800)	Desmielinizante	Dominante
<i>Locus Xp22.2</i>		CMT2X (302801)	Desmielinizante/Axonal	Recesivo
<i>Locus Xq26</i>		CMT3X (302802)	Desmielinizante/Axonal	Recesivo
<i>Locus Xq22-q26</i>		CMT4X (310490)	Axonal	Recesivo
<i>PRPS1</i>	Xq21-q24	CMT5X (311070)	Desmielinizante	Dominante Recesivo

GJB1/Cx32, gap junction protein B1/ connexin 32. *PRPS*, phosphoribosylpyrophosphate synthetase I; OMIM: base de datos cuyas siglas en inglés son, Online Mendelian Inheritance in Man.

Tabla 4.- Formas “intermedias” de la neuropatía de CMT.

Gen/Locus	Localización cromosómica	Fenotipo (OMIM)	Herencia
<i>Locus 10q24.1-q25.1</i>		DI-CMTA (606483)	Dominante Intermedia
<i>DMN2</i>	19p13-p12	DI-CMTB (606482)	Dominante Intermedia
<i>YARS</i>	1p35-p34	DI-CMTC (606323)	Dominante Intermedia
<i>MPZ</i>	1q22	DI-CMTD (607791)	Dominante Intermedia

DMN2, dynamin 2 gene ; *YARS*, tyrosyl-tRNA synthetase; *MPZ*, myelin protein zero gene ; OMIM: base de datos cuyas siglas en inglés son, Online Mendelian Inheritance in Man.

1.4.5.- Epidemiología

En dos investigaciones epidemiológicas recientes realizadas en población italiana y japonesa, la prevalencia estimada para la enfermedad de CMT es de 10.8 cada 100.000 individuos (Morocutti *et al.*, 2002) y 17.5 cada 100.000 individuos (Kurihara *et al.*, 2002) respectivamente. Los resultados obtenidos en la investigación epidemiológica en población italiana son comparables a los publicados en población española en el año 1987, cuya prevalencia fue estimada en 28.2 cada 100.000 individuos (Combarros *et al.*, 1987).

Comparando los datos epidemiológicos de población italiana con los elaborados en población española con respecto a la distribución de los diferentes subtipos de CMT (CMT1/CMT2), se estima que la relación de árboles genealógicos en población española es de 11/13 frente a 6/5 en población italiana. El 23% de los árboles genealógicos CMT estudiados presentaron un modo de herencia autosómico recesivo en población española, a diferencia del 15% obtenido en población italiana. En ambas poblaciones, las formas ligadas al X no fueron identificadas. Todos los pacientes que presentaron el fenotipo CMT1 en población italiana mostraron la duplicación 17p11.2 corroborando que el subtipo CMT1A es la forma más prevalente de CMT autosómico dominante desmielinizante en países occidentales (Nelis *et al.*, 1996). Esto probablemente no sucede en países orientales, ya que en población japonesa la forma mayoritaria es CMT1B (Kurihara *et al.*, 2002).

1.5.- GENÉTICA DE LA NEUROPATÍA DE CHARCOT-MARIE-TOOTH AUTOSÓMICA RECESIVA.

Las formas autosómicas recesivas de la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth suponen menos del 10% de todos los pacientes con CMT, representando al 4% de la población europea con CMT (Dubourg *et al.*, 2001). Contrariamente, en comunidades o poblaciones endogámicas (con un elevado porcentaje de

matrimonios consanguíneos), las formas autosómicas recesivas de CMT pueden aumentar en un 30-50% (Martin *et al.*, 1999), como ocurre en países de la cuenca mediterránea o en grupos étnicos específicos. De hecho el análisis genético realizado en familias originarias del norte de África ha permitido al descubrimiento de nuevos genotipos de la enfermedad de CMT. Por otro lado, en países occidentales la mayoría de pacientes con CMT que segregan con un modo de herencia autosómico recesivo suelen ser casos esporádicos o aislados.

1.5.1- Clasificación genética de ARCMT

Las formas autosómicas recesivas de la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth incluyen tanto formas desmielinizantes (CMT4; Tabla 1) como axonales (ARCMT2; Tabla 2), estando actualmente más estudiadas a nivel genético las formas desmielinizantes que las formas axonales. Clínicamente, las formas recesivas se diferencian de las dominantes, por la aparición temprana y progresión más agresiva de la enfermedad.

1.5.1.1- Formas desmielinizantes autosómicas recesivas (CMT4)

Dentro de las formas desmielinizantes de CMT autosómicas recesivas (CMT4) se distinguen diferentes subtipos, cada uno de los cuales presenta características clínicas, patológicas y particularidades étnicas específicas (Tabla 5). Asociados con las formas ARCMT desmielinizantes, se han cartografiado 11 loci y se han identificado 10 genes: *GDAP1* (CMT4A), *MTMR2* (CMT4B1), *MTMR13/SBF2* (CMT4B2), *SH3TC2* (CMT4C), *NDRG1* (CMT4D o NSMHL), *EGR2* (CMT4E), *PRX* (CMT4F), *FGD4* (CMT4H), *FIG4* (CMT4J) y *CTDPI* (CCFDN). El locus CMT4A fue originariamente cartografiado en la región cromosómica 8q21.3 a partir de los estudios realizados en cuatro familias tunecinas que mostraban un fenotipo grave (Ben Othmane *et al.*, 1993). Posteriormente, dos grupos de investigación independientes encontraron que el gen *GDAP1* estaba situado en esa región candidata 8q21 (Baxter *et al.*, 2002; Cuesta *et al.*, 2002). Tras la secuenciación de dicho gen en familias ARCMT en las que se obtuvo ligamiento

positivo a la región 8q21, se identificaron varias mutaciones causativas (Baxter *et al.*, 2002; Cuesta *et al.*, 2002). Algunos de estos pacientes ARCT con mutaciones en el gen *GDAP1* presentaron un fenotipo neuropático desmielinizante (Baxter *et al.*, 2002) mientras que otras familias ARCT mostraron un fenotipo axonal (Cuesta *et al.*, 2002). Así pues, la presencia de mutaciones en este mismo gen causan tanto la forma desmielinizante autosómica recesiva de CMT (Baxter *et al.*, 2002) como la forma axonal autosómica recesiva de CMT (Cuesta *et al.*, 2002, Azzedine *et al.*, 2003a; Birouk *et al.*, 2003). Recientemente, también se han descrito mutaciones en el gen *GDAP1* que causan una forma intermedia de CMT (Senderek *et al.*, 2003a), demostrando la complejidad alélica de las mutaciones *GDAP1*. La heterogeneidad genética de CMT4B se manifiesta por la presencia de dos formas asociadas a dos locus distintos: la forma CMT4B1, cartografiada en el cromosoma 11q22 causada por la presencia de mutaciones en el gen *MTMR2* (Bolino *et al.*, 2000) y la forma CMT4B2, cartografiada en el locus 11p15 (Othmane *et al.*, 1999), cuyo gen responsable (*MTMR13/SBF2*) fue identificado independientemente por dos grupos de investigación en familias consanguíneas que mostraron diferentes fenotipos (Senderek *et al.*, 2003b; Azzedine *et al.*, 2003b). La forma CMT4E localizada en el cromosoma 10q21-22 está causada por la presencia de mutaciones en el gen *EGR2* (Warner *et al.*, 1998). Mutaciones en este gen no sólo causan la forma recesiva CMT4E sino que se asocian con otros fenotipos dominantes de CMT, como son la neuropatía hipomielinizante congénita (NHC) o la forma CMT1D. La forma CMT4F fue cartografiada en el cromosoma 19q13 en una familia de origen libanés (Delague *et al.*, 2000) y se identificó al gen *PRX* como causante de dicho fenotipo (Boerkoel *et al.*, 2001b; Guilbot *et al.*, 2001). La forma CMT4H fue cartografiada en el locus cromosómico 12p11.21-q13.11 (De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2005) y recientemente, se han descrito mutaciones en el gen *FGD4* como la causa de la enfermedad (Delague *et al.*, 2007; Stendel *et al.*, 2007). La forma CMT4J ha sido descrita recientemente por Chow y colaboradores

(2007) e identificadas mutaciones patogénicas en el gen *FIG4* en el cromosoma 6q21 como la causa de esta nueva forma de CMT4 (Chow *et al.*, 2007).

Como ya hemos mencionado anteriormente, las formas desmielinizantes autosómicas recesivas pueden convertirse en las formas más comunes en poblaciones o comunidades con un elevado grado de consanguinidad, tales como en países de la cuenca mediterránea o en grupos étnicos específicos. Esto ocurre en la población romaní o de etnia gitana, en la que se han descrito tres formas de CMT4: CMT4D o HMSN-Lom, CMT4G o HMSN-Russe y CCFDN. La forma CMT4D o HMSN-Lom (neuropatía sensitivo-motora hereditaria Lom) fue descrita en familias búlgaras de origen romaní procedentes de la ciudad de Lom, cuyo locus fue cartografiado en el cromosoma 8q24 (Kalaydjieva *et al.*, 1996). La enfermedad está causada por la presencia de una única mutación ancestral (p.R148X) en el gen *NDRG1*. La neuropatía sensitivo-motora hereditaria-Russe (HMSN-Russe o CMT4G) identificada en familias romaní de origen búlgaro, rumano y español, se ha cartografiado en el cromosoma 10q23 (Rogers *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2001) permaneciendo desconocido el gen causante de la enfermedad. El síndrome de neuropatía congénita con dimorfismo facial y cataratas (CCFDN) también fue descrito en familias romaní de origen búlgaro, cartografiada en el cromosoma 18qter (Angelicheva *et al.*, 1999) y causada por la presencia de una única mutación en el gen *CTDPI*. Finalmente, la forma CMT4C fue cartografiada en el locus 5q23-q33 (LeGuern *et al.*, 1996) y se asocia con la presencia de mutaciones en el gen *SH3TC2* (Senderek *et al.*, 2003c). Inicialmente, mutaciones en dicho gen habían sido descritas en familias con diferente origen geográfico: argelinas, francesas, alemanas, iraníes, griegas, italianas, holandesas y turcas (LeGuern *et al.*, 1996; Gabreëls-Festen *et al.*, 1999; Guilbot *et al.*, 1999; Senderek *et al.*, 2003c; Azzedine *et al.*, 2006), aunque recientemente también se han identificado en población romaní de origen español (Claramunt *et al.* 2007).

Tabla 5.- Principales características de CMT desmielinizante autosómico recesivo o CMT4.

Locus Gen	Edad de Aparición	Características Clínicas	VCN (m/s)	Características Histopatológicas	Origen
CMT4A <i>GDAP1</i>	<3 años	Debilidad distal + proximal de las extremidades	25-35	Hipomielinización, desmielinización segmentada, bulbos de cebolla	Túnez, Libia, Argelia, Holanda
CMT4B1 <i>MTMR2</i>	<4 años	Debilidad distal + proximal de las extremidades, debilidad diafragmática, facial y bulbar Debilidad distal y a veces proximal de las extremidades, glaucoma congénito en algunos pacientes	9-20	Plegamientos focales de la mielina, pérdida de fibras mielinizadas	Italia, Arabia Saudí, Inglaterra, India
CMT4B2 <i>MTMR13/SBF2</i>	1ª década	Debilidad distal y a veces proximal de las extremidades, aparición temprana y grave de escoliosis	15-30	Plegamientos focales de la mielina, pérdida de fibras mielinizadas	Túnez, Marruecos, Turquía
CMT4C <i>SH3TC2</i>	1ª o 2ª década	Debilidad distal y a veces proximal de las extremidades, aparición temprana y grave de escoliosis	4-37	Bulbos de cebolla en la membrana basal, expansiones citoplasmáticas de las células de Schwann, pérdida de fibras mielinizadas	Argelia, Alemania, Grecia, Irán, Italia, Holanda, Turquía, Población romaní española y albanesa
CMT4D <i>NDRG1</i>	<10 años	Debilidad distal + proximal de las extremidades, sordera sensorineural, atrofia lingual	10-20	Hipomielinización, bulbos de cebolla, pérdida de fibras mielinizadas, inclusiones axonales y mielina descomprimida	Población romaní de Bulgaria, Eslovenia, España e Italia
CMT4E <i>EGR2</i>	Desde el nacimiento	Hipotonía congénita	5-20	Hipomielinización congénita	Estados Unidos

GDAP1, ganglioside-induced differentiation-associated protein 1; *MTMR2*, myotubularin-related protein 2; *MTMR13/SBF2*, myotubularin-related protein 2/set-binding factor 2; *SH3TC2*, sh3 domain and tetratricopeptide repeat domain 2; *NDRG1*, nmyc downstream-regulated gene 1; *EGR2*, early growth response 2.

Tabla 5 (Continuación).- Principales características de CMT desmielinizante autosómico recesivo o CMT4.

Locus Gen	Edad de Aparición	Características Clínicas	VCN (m/s)	Características Histopatológicas	Origen
CMT4F <i>PRX</i>	<7 años	Debilidad distal y a veces proximal de las extremidades	<5	Bulbos de cebolla, plegamientos focales de la mielina	Libia, Estados Unidos, norte Europa
CCFDN <i>CTDPI</i>	2-3 años	Cataratas congénitas y microcórnea, dimorfismo facial, retraso mental, neuropatía periférica motora distal	19-33	Hipomielinización difusa	Población romaní Bulgaria
HMSN-Russe 10q22-q23	8-16 años	Debilidad distal + proximal de las extremidades	30-35	Hipomielinización, clusters de regeneración	Población romaní Bulgaria
CMT4H <i>FGD4</i>	1-2 años	Debilidad distal de las extremidades, menor en extremidades superiores	Disminuída	Hipomielinización, pequeños bulbos de cebolla y a veces plegamientos focales de la mielina	Líbano, Argelia
CMT4J <i>FIG4</i>	2-5 años	Debilidad distal y a veces proximal de las extremidades	Disminuída	Pérdida axonal, pocas fibras mielinizadas y procesos de re- y desmielinización	

NDRG1, *nmyc downstream-regulated gene 1*; *EGR2*, *early growth response 2*; *PRX*, *periaxin*; *CTDPI*, *c-terminal domain of rna polymerase ii subunit a*, *phosphatase of, subunit 1*; *FGD4*, *frabin*; *FIG4*.

1.5.1.2- Formas axonales autosómicas recesivas (ARCMT2)

ARCMT2 generalmente se ha descrito como una condición rara y grave (Gemignani y Marbini, 2001; Vallat *et al.*, 2004, 2005), aún siendo la primera forma publicada desde un punto de vista clínico y genealógico en 1968 (Dyck y Lambert 1968a, b). Hasta hace poco, únicamente se había descrito en algunas familias (Harding y Thomas, 1980; Ouvrier *et al.*, 1981; Gabrëels-Festen, 1991; Bouhouche *et al.*, 1999; Bahroumi *et al.*, 2001; Leal *et al.*, 2001). A pesar de que algunos genes, cuyas mutaciones son principalmente responsables de otras enfermedades neurológicas graves, se hayan incluido ocasionalmente como responsables de formas ARCMT2 como son la atrofia muscular espinal tipo I (Bouhouche *et al.*, 2003; Rudnig-Schoneborn *et al.*, 2003) y/o la neuropatía de las células gigantes (Nafé *et al.*, 2001), hasta este momento se han cartografiado tres loci ARCMT2 específicos en los cromosomas 8q (Ben Otthmane *et al.*, 1993; Bahroumi *et al.*, 2001), 1q (Bouhouche *et al.*, 1999), y 19q (Leal *et al.*, 2001), e identificado los genes causantes de estas tres formas ARCMT2: *GDAP1* (Baxter *et al.*, 2002; Cuesta *et al.*, 2002), *LMNA* (De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2002) y *MED25* (Rautenstrauss *et al.*, 2005a).

La forma ARCMT2A/CMT2B1 fue localizada originariamente en la región cromosómica 1q21.2-q21.3 a partir de los estudios de ligamiento realizados en una familia consanguínea de origen marroquí diagnosticada clínicamente como CMT2 (Bouhouche *et al.*, 1999). Posteriormente en el año 2002, utilizando la estrategia del cartografiado por homocigosidad en familias argelinas con ARCMT2, se estableció ligamiento al cromosoma 1q21.1-21.3 (De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2002). Ambos intervalos críticos de ligamiento tanto en familias marroquíes como argelinas solapaban parcialmente, y mostraron características clínicas comunes sugiriendo la presencia de un único gen implicado en la forma ARCMT2 en estas familias. Tras la secuenciación completa de los genes candidato localizados dentro del intervalo crítico, el gen *LMNA* fue considerado como un fuerte candidato debido a su localización y a su expresión en el desarrollo neuronal. Debido a la

descripción de mutaciones en el gen *LMNA* como la causa de otras enfermedades (Bonne *et al.*, 1999; Fatkin *et al.*, 1999; Muchir *et al.*, 2000; Shackleton *et al.*, 2000) junto con el fenotipo clínico mostrado en ratones homocigotos con el gen *LMNA* inactivado (Sullivan *et al.*, 1999), constituyeron argumentos suficientes para la búsqueda de mutaciones en dicho gen. Así pues, se identificó una única mutación en homocigosis en todos los pacientes de familias argelinas y marroquíes ligadas al locus *ARCMT2*, así como en otros pacientes procedentes de una tercera familia no relacionada (De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2002). La segunda forma *ARCMT2*, inicialmente fue cartografiada en el cromosoma 8q13-8q21.1 a partir de los estudios de ligamiento realizados en familias con CMT desmielinizante (Ben Otthmane *et al.*, 1993). Posteriormente, se observó que esta región cromosómica solapaba con el locus *CMT4A* en una familia tunecina, cuyos pacientes enfermos presentaron una forma axonal asociada con un síndrome piramidal (Bahroumi *et al.*, 2001). Aunque el fenotipo clínico era distinto cabía la posibilidad de que el mismo gen fuera el causante de estas dos entidades de CMT. Tras la identificación simultánea por parte de dos grupos de investigación del gen *GDAP1* en ese intervalo cromosómico (Baxter *et al.*, 2002; Cuesta *et al.*, 2002), se demostró que mutaciones en el mismo gen eran responsables tanto de la forma desmielinizante autosómica recesiva (*CMT4A*) (Baxter *et al.*, 2002) como de la forma axonal autosómica recesiva (*ARCMT2*) (Cuesta *et al.*, 2002). La tercera forma *ARCMT2* (*ARCMT2B2*), fue descrita por Leal y colaboradores (2001) en una familia de origen costarricense con *ARCMT2*, quienes observaron ligamiento en el cromosoma 19q13.3 (Leal *et al.*, 2001), región en la que se había identificado el gen *PRX* causante de la forma *CMT4F* (Boerkoel *et al.*, 2001; Guilbot *et al.*, 2001). Tras el cribado molecular de los 53 genes incluidos en esta región, recientemente se han identificado mutaciones en el gen *MED25* como la causa de esta forma de *ARCMT2* (Rautenstrauss *et al.*, 2005b).

1.5.2- Genes, mutaciones y mecanismos moleculares

Como hemos descrito en apartados anteriores, se han identificado un total de 12 genes asociados con las formas autosómicas recesivas de la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth. Una lista de estos genes y de las mutaciones encontradas en CMT puede consultarse en la base de datos de las mutaciones de las neuropatías periféricas hereditarias (IPNMDB) cuya página web es <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/default.cfm>, así como la clasificación de CMT y los fenotipos asociados puede consultarse en la página web <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/time/hmsn.html>. De estos 12 genes asociados con las formas ARCMT y a excepción de *GDAP1* y *EGR2*, cuyas mutaciones pueden dar lugar a distintos fenotipos de CMT (CMT4A o ARCMT2; CMT4E o CMT1D), el resto de genes causan primariamente bien formas desmielinizantes “(*MTMR2*, CMT4B1; *MTMR13/SBF2*, CMT4B2)”; “(*SH3TC2*, CMT4C)”; “(*NDRG1*, CMT4D o HMSN-Lom)”; “(*PRX*, CMT4F)”; “(*FGD4*, CMT4H)”; “(*FIG4*, CMT4J)”; “(*CTDPI*, CCFDN)”, bien formas axonales “(*LMNA*, ARCMT2A)”; “(*MED25*, ARCMT2B2)”. Mutaciones en los genes *NDRG1* y *CTDPI* se han descrito únicamente en familias de etnia gitana. A continuación se resumen las bases moleculares de los genes causantes de la neuropatía CMT autosómica recesiva tanto de sus formas desmielinizantes como axonales, que codifican proteínas o factores de transcripción implicados en la formación de la mielina (*PRX*), regulación de los genes de la mielina (*EGR2*), síntesis, destino y/o degradación de proteínas (*MTMR2*, *MTMR13/SBF2* y *NDRG1*), alteración de las mitocondrias (*GDAP1*), formación de la lámina nuclear (*LMNA*), regulación del tráfico vesicular de la membrana (*FIG4*), control de rutas implicadas en la traducción de señales (*FGD4*) y activadores/intermediarios de la transcripción (*CTDPI* y *MED25*).

1.5.2.1.- Mutaciones puntuales en el gen *GDAP1*

El gen *GDAP1* consta de seis exones y codifica una proteína de 358 aminoácidos, la cual pertenece a una nueva subfamilia de las glutation-S-transferasas (Marco *et al.*, 2004). Recientemente se ha demostrado que la proteína *GDAP1* se expresa predominantemente en las células neuronales (Pedrola *et al.*, 2005), aunque también lo hace en las células de Schwann, sugiriendo que ambos tipos celulares podrían contribuir en la variabilidad fenotípica de la enfermedad (Niemann *et al.*, 2005). La proteína *GDAP1* se localiza en la membrana mitocondrial externa (Niemann *et al.*, 2005; Pedrola *et al.*, 2005), la sobreexpresión de la proteína *GDAP1* induce la fragmentación de la mitocondria sugiriendo la participación de la proteína *GDAP1* en las rutas de fusión y fisión de las mitocondrias dinámicas (Pedrola *et al.*, 2005). Recientemente, se ha sugerido que los dominios transmembrana de la proteína *GDAP1* no parecen tener un papel directo en el proceso de fisión de la red de las mitocondrias dinámicas (Pedrola *et al.*, 2008). Se han descrito 23 mutaciones diferentes en el gen *GDAP1* (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/default.cfm>), 11 de las cuales son mutaciones no sinónimas (*missense*) en la que se produce una sustitución de un aminoácido por otro, 4 de ellas son mutaciones sin sentido (*nonsense*) que introducen un codón de terminación de la traducción prematuro, 6 mutaciones con desplazamiento de la pauta de lectura (*frameshift*) generalmente debido a la presencia de inserciones o deleciones, y 2 mutaciones en el sitio de *splicing* que altera o suprime la secuencia específica que indica el sitio en el que tiene lugar el *splicing* de un intrón. Todas las mutaciones descritas se localizan en la secuencia codificante del gen, a excepción del exón 2, y varias de ellas han sido encontradas repetidamente en diferentes familias no emparentadas entre sí y con diferente origen geográfico. Estudios recientes han demostrado que las mutaciones p.Q163X (c.487C>T), p.S194X (c.581>G), p.T288fsX3 (c.862_863insA), y p.M116R (c.347T>G) descritas en familias y/o pacientes esporádicos no emparentadas entre sí, muestran un efecto fundador (Claramunt *et al.*, 2005; Di Maria *et al.*, 2004).

Aunque la mayoría de mutaciones encontradas en el gen *GDAP1* segregan con la enfermedad de CMT con un modo de herencia autosómico recesivo, dando lugar a los fenotipos CMT4A o ARCMT2, también se han descrito mutaciones en el gen *GDAP1* que segregan tanto con formas intermedias de ARCMT (Senderek *et al.*, 2003a) como con formas autosómicas dominantes (Claramunt *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2008). De las mutaciones en el gen *GDAP1* que parecen expresarse de forma dominante dos de ellas, p.R120W (c.358C>T) (Claramunt *et al.*, 2005) y p.Q218E (c.652C>G) (Chung *et al.*, 2008) muestran un fenotipo clínico moderado, a diferencia de las formas autosómicas recesivas que presentan un fenotipo clínico grave, mientras que la tercera mutación encontrada, p.T157P (c.469A>C) (Claramunt *et al.*, 2005), se asocia con la enfermedad mostrando un fenotipo grave con atrofia del nervio óptico; esta nueva forma de CMT ha sido designada como CMT2K. En un intento de relacionar la presencia de mutaciones en el gen *GDAP1* con la enfermedad de CMT y aunque todavía no han sido totalmente demostrados los efectos que estas mutaciones pueden producir en las mitocondrias, sí se ha observado que la sobreexpresión de la proteína GDAP1 altera morfológicamente las mitocondrias (Pedrola *et al.*, 2008). En este sentido, se ha observado que las mutaciones no sinónimas en el gen *GDAP1* muestran dos patrones morfológicos diferentes en las mitocondrias: la mayoría de ellas inducen a la fragmentación mitocondrial a excepción de la mutación p.T157P que muestra un patrón de agregación (Pedrola *et al.*, 2008). Esto sugiere que, a diferencia de las mutaciones *GDAP1* que predicen una proteína truncada deberían estar asociadas con una pérdida de función de la proteína, en el caso de mutaciones no sinónimas podrían actuar a través mecanismos patogénicos diferentes incluyendo un efecto dominante-negativo, y por tanto, podrían existir diferentes mecanismos moleculares que explicarían la patogénesis de CMT producida por mutaciones *GDAP1* (Pedrola *et al.*, 2008). Así pues, la enfermedad de CMT causada por mutaciones en el gen *GDAP1* demuestra que la regulación adecuada de las

mitocondrias es un factor crítico para el funcionamiento correcto de los nervios periféricos mielinizados.

1.5.2.2.- Mutaciones puntuales del gen *MTMR2* y *MTMR13/SBF2*

Las proteínas *MTMR2* y *MTMR13/sbf2* pertenecen a la familia de las miotubularinas, caracterizadas por la presencia de un dominio fosfatasa con especificidad dual, e implicadas en la regulación de las membranas dinámicas (Wishart y Dixon, 2002). Mutaciones en tres genes de esta familia están asociadas con enfermedades humanas aunque sólo dos de ellos se asocian con CMT, *MTMR2* y *MTMR13*, causando las formas desmielinizantes recesivas CMT4B1 y CMT4B2, respectivamente (Laporte *et al.*, 1996; Bolino *et al.*, 2000; Azzedine *et al.*, 2003; Senderek *et al.*, 2003b). En el gen *MTMR2* se han descrito mutaciones sin sentido (*nonsense*), con desplazamiento de la pauta de lectura (*frameshift*) y pérdida de exones (*exon skipping*) (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/default.cfm>). Para estas mutaciones se postula un mecanismo de pérdida de la función normal de la proteína. Las miotubularinas activas defosforilan a los sustratos PI-3-P, PI-3 y 5-P2 (*Dephosphorylates phosphatidylinositol 3-phosphate, phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate*), sin embargo la presencia de mutaciones en el gen *MTMR2* producen una reducción drástica de la actividad fosfatasa hacia estos sustratos. Debido a que las miotubularinas presentan una alta especificidad de sustrato su función parece estar relacionada con la regulación del proceso de endocitosis, destino y degradación de las proteínas. Esta hipótesis está sustentada por los hallazgos obtenidos tanto en *Caenorhabditis elegans* en los que la presencia de mutaciones *MTMR2* bloquean el proceso de endocitosis (Dang *et al.*, 2004) como en que los sustratos PI-3-P, PI-3 y 5-P2 son utilizados como adaptadores de membrana para proteínas implicadas en las etapas tempranas y tardías del proceso de endocitosis. Por otro lado, en el gen *MTMR13/SBF2* se han encontrado mutaciones sin sentido (*nonsense*), con desplazamiento de la pauta de lectura (*frameshift*) y mutaciones de

los sitios de *splicing* (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/default.cfm>), postulando un mecanismo de pérdida de la función normal de la proteína. Aunque MTMR2 interacciona directamente con MTMR13/sbf2, se desconoce el motivo por el cual causan la misma patología (Berger *et al.*, 2006; Robinson y Dixon, 2005).

1.5.2.3.- Mutaciones puntuales en el gen *SH3TC2*

El gen *SH3TC2* codifica una proteína de función desconocida que contiene motivos SH3 y TPR, y se expresa en tejido nervioso incluyendo a los nervios periféricos. El dominio SH3 y el motivo TPR median la asociación de complejos proteicos aunque los intermediarios de esta proteína no están todavía descritos. Mutaciones en el gen *SH3TC2* se asocian con la neuropatía desmielinizante recesiva CMT4C (Senderek *et al.*, 2003c). Se han descrito mutaciones sin sentido, no sinónimas, con desplazamiento de la pauta de lectura y en los sitios de *splicing* (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/default.cfm>), en familias con distinto origen geográfico: argelinas, francesas, alemanas, iraníes, griegas, italianas, holandesas y turcas (LeGuern *et al.*, 1996; Gabreëls-Festen *et al.*, 1999; Guilbot *et al.*, 1999; Senderek *et al.*, 2003c; Azzedine *et al.* 2006). Recientemente, también se ha detectado la presencia de mutaciones en familias de origen romaní o de etnia gitana, siendo diferentes a las descritas anteriormente. Se han descrito 2 mutaciones, una mutación con efecto fundador (p.R1109X) que da lugar a un codón de terminación de la traducción, y una mutación con desplazamiento de la pauta de lectura originada por la delección de tres nucleótidos (c.2211_2213delCCC; p.C737_P738delinsX) que predicen en ambos casos una proteína truncada. Mayoritariamente, en todos los pacientes se ha encontrado la mutación p.R1109X en homocigosis (Gooding *et al.*, 2005; Claramunt *et al.*, 2007), a excepción de una única familia de etnia gitana de origen español, con seis pacientes enfermos, que son heterocigotos compuestos para ambas mutaciones (Claramunt *et al.*, 2007).

1.5.2.4.- Mutación ancestral del gen *NDRGI*

El gen *NDRGI* codifica una proteína que se expresa en las células de Schwann (Berger *et al.*, 2004), originando la neuropatía desmielinizante recesiva CMT4D o HMSN-Lom, que se ha descrito únicamente en familias y/o casos aislados de etnia gitana con diferente origen geográfico. Consistente con este fenotipo desmielinizante son los hallazgos observados tanto en humanos como en ratones *knockout* *Ndrgl* (Hunter *et al.*, 2003; Okuda *et al.*, 2004), que apoyan la propuesta de que el gen *NDRGI* podría tener un papel importante en el mantenimiento de las vainas de mielina en los nervios periféricos. La neuropatía sensitivo-motora hereditaria Lom (HMSN-Lom) o CMT4D está causada por la presencia de dos mutaciones en el gen *NDRGI*: la mutación ancestral sin sentido p.R148X (c.564C>T) (Kalaydjieva *et al.*, 2000) que introduce un codón de terminación de la traducción prematuro y la mutación IVS8-1G>A (g.2290787G>A) (Hunter *et al.*, 2003) que afecta al sitio aceptor de *splicing* en el intrón 8 produciendo la pérdida del exón 9; en ambos casos se presupone la generación de una proteína truncada. La mutación p.R148X, que es la más frecuente en pacientes HMSN-Lom, se ha detectado en homocigosis en todos los pacientes, destacando la alta frecuencia de portadores de esta mutación entre individuos sanos pertenecientes a dicho grupo étnico. Así por ejemplo, en la ciudad de Lom (Bulgaria) donde fue diagnosticada por primera vez en familias búlgaras la forma CMT4D (Kalaydjieva *et al.*, 1996), la frecuencia de portadores se ha estimado en un 16.1% en un total de 124 pacientes sanos de etnia gitana. Esta misma frecuencia de portadores se ha estimado en un 6.1% en un total de 443 pacientes control de etnia gitana procedentes de diferentes países. Sin embargo, la frecuencia total de la mutación es tan sólo del 2.2%, si excluimos al grupo de pacientes enfermos procedentes de la ciudad de Lom (Kalaydjieva *et al.*, 2001; Navarro y Teijeira, 2003). La mutación IVS8-1G>A descrita en homocigosis en dos pacientes muestran un fenotipo clínico muy similar al descrito en pacientes

HMSN-Lom (Hunter *et al.*, 2003). En el trabajo realizado por Hunter y colaboradores (2003) en el que se identificó una nueva mutación causante de CMT4D, se establece que el porcentaje de mutaciones en el gen *NDGRI* en su serie de estudio es del 2.88%.

1.5.2.5.- Mutaciones puntuales en el gen *EGR2*

El gen *EGR2* es un factor de transcripción con dominios de dedo de zinc. Se expresa abundantemente durante la mielinización del sistema nervioso periférico y principalmente está implicado en la regulación de la expresión de los genes de la mielina, como *MPZ* (Hayasaka *et al.*, 1993a, b), *PMP22* (Lupski *et al.*, 1991; Matsunami *et al.*, 1992; Timmerman *et al.*, 1992; Valentijn *et al.*, 1992), *Cx32/GJB1* (Bergoffen *et al.*, 1993), y *PRX* (Boerkoel *et al.*, 2001b; Guilbot *et al.*, 2001). Mutaciones en el gen *EGR2* pueden heredarse de un modo autosómico dominante (CMT1D) o autosómico recesivo (CMT4E), ambos subtipos asociados con un fenotipo desmielinizante. Además, la presencia de mutaciones en el gen *EGR2* se asocia con otros fenotipos, como la neuropatía de Déjérine-Sottas (DS), la neuropatía con hipomielinización congénita (NHC) y formas dominantes desmielinizantes CMT1 de aparición tardía (Boerkoel *et al.*, 2001a; Yoshihara *et al.*, 2001). Sin embargo, a pesar de la gran heterogeneidad fenotípica que causan la presencia de mutaciones en el gen *EGR2* se han descrito pocas mutaciones (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/default.cfm>), representando la relación CMT1D/CMT4E menos del 1% de todos los pacientes con CMT (Boerkoel *et al.*, 2002; Numakura *et al.*, 2003). Todas las mutaciones encontradas en el gen *EGR2* son no sinónimas y para las que se postula un mecanismo de pérdida de la función normal de la proteína. Mutaciones en los dominios con dedo de zinc se asocian con la forma dominante CMT1D afectando a los dominios reguladores de unión del ADN con los genes diana, lo cual se correlaciona con la gravedad de la enfermedad (Warner *et al.*, 1998). Por otro lado, la mutación p.I268N (c.803T>A), localizada en el dominio R1 de la proteína *EGR2*, causa la

forma recesiva CMT4E pudiendo afectar a la interacción con sus co-reguladores, las proteínas de unión NGFI-A (NABs; Warner *et al.*, 1998; Warner *et al.*, 1999).

1.5.2.6.- Mutaciones en el gen *PRX*

El gen *PRX* codifica dos proteínas con dominios PDZ, L-periaxina y S-periaxina, que se expresan en las células de Schwann mielinizantes. Durante la mielinización, la L-periaxina se localiza predominantemente en la membrana adaxonal, pero cuando finaliza dicho proceso se ubica en la membrana abaxonal, las incisuras de Schmidt-Lantermann y membranas paranodales (Gillespie *et al.*, 1994). Las periaxinas interactúan a través de los dominios PDZ con proteínas que permiten conectar el citoesqueleto de la célula de Schwann con la matriz extracelular, por lo que se postula que juegan un papel esencial en el mantenimiento de la mielina en el nervio periférico (Sherman *et al.*, 2001). Se han descrito dos mutaciones en este gen que se asocian con la forma desmielinizante recesiva CMT4F, una mutación sin sentido y otra con desplazamiento de la pauta de lectura (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/default.cfm>), que predicen una proteína truncada. El resto de mutaciones descritas en el gen *PRX* causan la neuropatía de Déjérine-Sottas (DS) (Boerkoel *et al.*, 2001b; Takashima *et al.*, 2002).

1.5.2.7.- Mutaciones puntuales en el gen *FGD4*

El gen *FGD4* codifica la proteína FABRINA (*FGDI-related F-actin binding protein*) que es un factor GDP/GTP de intercambio de nucleótidos (GEF), específico para *Cdc42*, un miembro de la familia Rho de pequeñas guanosinas trifosfato (GTP)- de unión de proteínas (Rho GTPasas). Las Rho GTPasas desempeñan un papel clave en la regulación de las señales en las vías de transducción de eucariotas. En particular, tienen un papel fundamental en la mediación de cambios del citoesqueleto de actina durante la migración celular, morfogénesis, la polarización y la división (Delague *et al.*, 2007). Mediante la

estrategia de cartografiado por homocigosidad en dos familias consanguíneas de origen argelino y libanés fue establecido el locus CMT4H en la región cromosómica 12p11.1-q13.11 (De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2004). Se han descrito cinco mutaciones diferentes, dos mutaciones sin sentido (p.G586X; p.R224X) y una mutación con desplazamiento de la pauta de lectura (p.E543fs) (Stendel *et al.*, 2007) que predicen una proteína truncada y dos mutaciones no sinónimas (p.M298R; p.M298T) (Delague *et al.*, 2007; Stendel *et al.*, 2007) en cinco familias y un caso esporádico; La mutación p.M298R que inicialmente fue descrita como una mutación sin sentido, es en consecuencia también una mutación en el sitio de *splicing* ya que probablemente resultaría en una proteína truncada (p.298MfsX8) (Delague *et al.*, 2007; Stendel *et al.*, 2007).

1.5.2.8.- Mutaciones puntuales en el gen *FIG4*

La proteína FIG4 forma parte junto con VAC14 de un complejo proteico regulador de la síntesis de la molécula fosfatoinositol 3,5 bifosfato (PI(3,5)P₂), una molécula de señalización poco abundante, mediante la activación de kinasa PI(3)P, FAB1. Este complejo FIG4/VAC14 también interviene en la degradación de PI(3,5)P₂ (Zhang *et al.*, 2007). Se han identificado cinco mutaciones patogénicas, tres con desplazamiento de la pauta de lectura (p.F98fsX102; p.G253fsX261; p.D348fsX359) y una sin sentido (p.R183X) que predicen una proteína truncada, y una mutación no sinónima (p.I41T) en cuatro pacientes no relacionados entre sí con neuropatía hereditaria sensitivo-motora que causan la forma CMT4J (Chow *et al.*, 2007).

1.5.2.9.- Mutación puntual en el gen *CTDPI*

El gen *CTDPI* codifica la proteína FCP1 (*TFIIF-associated CTD phosphatase-1*) que defosforila el dominio C-terminal de la subunidad más grande de la ARN polimerasa II y regula el reclutamiento de las proteínas implicadas en la

transcripción del ARN mensajero (Varon *et al.*, 2003). Una única mutación en este gen, descrita en un grupo específico de familias de etnia gitana de Bulgaria (Rudari Vlach Roma), causa la neuropatía congénita con dimorfismo facial y cataratas (CCFDN) que se transmite de modo autosómico recesivo. Esta mutación es una sustitución nucleotídica C>T en el elemento Alu localizado en el intrón 6 del gen *CTDPI* (IVS6+389C-T), dando lugar a un mecanismo de *splicing* anómalo que resulta en la introducción de 95 nucleótidos en el ARNm del gen *CTDPI* (Varon *et al.*, 2003; Shabo *et al.*, 2005). Esta inserción genera una señal de terminación prematura 17 codones después del exón 6 del gen *CTDPI*, que presuponen la síntesis de una proteína truncada y un mecanismo de pérdida de la función normal de la proteína. Varon y colaboradores (2003) observaron un producto anormal de la proteína en todos los tipos celulares estudiados, sin considerar su implicación en el fenotipo clínico. Por otro lado, en un estudio realizado en 887 pacientes de población control del grupo específico Rundari se estimó la frecuencia de portadores de dicha mutación en un 6.9%, estableciéndose en un 0.6% en otras poblaciones de etnia gitana y en el 0.0% en otras poblaciones europeas no de etnia gitana (Varon *et al.*, 2003; Morar *et al.*, 2004) .

1.5.2.10.- Mutaciones puntuales en el gen *LMNA*

El gen *LMNA* codifica cuatro isoformas de Lamininas A/C a través de un mecanismo de *splicing* alternativo, siendo la Laminina A y C las isoformas mayoritarias. Se expresan en el núcleo de todas las células diferenciadas en vertebrados (Rober *et al.*, 1989; Gruenbaum *et al.*, 2005) y ambas se localizan en la periferia nuclear, constituyendo la lámina nuclear subyacente a la membrana nuclear interna, y en el nucleoplasma. Las lamininas A/C participan en diversas funciones nucleares, sobretodo en la regulación de la expresión de genes, a través de la interacción con un gran número de moléculas, y en el mantenimiento de la estabilidad del genoma (Zastrow *et al.*, 2004; Gruenbaum *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005). Dada la diversidad de funciones, mutaciones en el gen *LMNA* se asocian

con una gran variedad de fenotipos, entre los cuales está la forma axonal autosómica recesiva ARCMT2A (Bonne *et al.*, 1999; Fatkin *et al.*, 1999; Muchir *et al.*, 2000; Shackleton *et al.*, 2000). Se ha identificado una única mutación en homocigosis en el gen *LMNA* que segrega con la enfermedad en todas las familias ARCMT2 ligadas al cromosoma 1q21 (De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2002; Tazir *et al.*, 2004; Bouhouche *et al.*, 2007). Esta mutación no sinónima, p.R298C (c.C892T), da lugar a una sustitución aminoacídica en el dominio central de la Laminina A/C, esencial en las interacciones proteína-proteína, para la que se postula un mecanismo de pérdida de función de la proteína normal. La identificación de un haplotipo ancestral común en familias argelinas y marroquíes, cuyos pacientes enfermos son homocigotos para la mutación p.R298C, sugiere un mecanismo fundador.

1.5.2.11.- Mutación puntual en el gen *MED25*

El gen *MED25* codifica una subunidad del complejo mediador asociado con la ARN polimerasa II (Rautenstrauss *et al.*, 2005a), también conocido como ARC92 o ACIDI, es un activador de la transcripción permaneciendo desconocida su función fisiológica concreta en la regulación de la transcripción. Leal y colaboradores (2001) publicaron los datos de una familia Costarricense con neuropatía CMT axonal autosómica recesiva en la que se obtuvo ligamiento a la región cromosómica 19q13.3, donde se localiza el gen de la periaxina cuyas mutaciones causan CMT4F. Posteriormente, en los pacientes de esta misma familia fue identificada una única mutación no sinónima en homocigosis en el gen *MED25*, p.A335V, para la que se predice un mecanismo de pérdida de función de la proteína normal (Rautenstrauss *et al.*, 2005a). A esta nueva forma axonal de ARCMT se le designó el nombre de ARCMT2B. Debido a que en estos pacientes ARCMT2B2 se observa desmielinización con carácter moderado, se ha investigado la expresión del gen en modelos de ratón en los que el gen está sobre-expresado o deprimido; Se observó una correlación positiva en los niveles de expresión entre

ratones *Med25* y ratones *Pmp22* (Rautenstrauss *et al.*, 2005b). Globalmente estos resultados sugieren una etiología molecular de ARCMT2B2 y un papel más general del gen *MED25* en la patología de diferentes neuropatías periféricas hereditarias.

1.6.- IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS A ENFERMEDADES HUMANAS

La elección de la estrategia a seguir para identificar el gen responsable de una enfermedad depende de los recursos disponibles (modelos animales, anomalías cromosómicas, etc), o bien de los conocimientos que se tengan acerca de la patogénesis de la enfermedad. Algunas de las estrategias comienzan por intentar identificar varios genes candidatos que deben ser estudiados con el objetivo de hallar evidencias que los señalen como responsables de la enfermedad (Strachan y Read, 1999). Las estrategias clásicas para el aislamiento de genes mutantes de enfermedades humanas son:

1.6.1.- Clonación funcional



En esta aproximación la identificación del gen desconocido causante de la enfermedad se basa en la información disponible sobre su función, sobre las bases bioquímicas de la enfermedad.

1.6.2.- Clonación posicional



La clonación posicional implica la clonación de un gen del que se desconoce prácticamente todo menos su localización subcromosómica sin tener

información sobre su función bioquímica o su papel en la patogénesis. La estrategia general consiste en construir mapas genéticos y físicos de la región, refinar la localización subcromosómica y entonces aislar genes en la región para investigarlos como candidatos de la enfermedad. En el caso de que haya genes ubicados en el intervalo crítico se habla de la estrategia del candidato posicional. La localización inicial suele definir una región candidata relativamente grande, de 10 cM o más. El método elegido para estas localizaciones iniciales depende de las características y el modo de herencia de la enfermedad.

1.6.2.1.- Localización cromosómica

Durante la meiosis se produce un proceso de intercambio de fragmentos de DNA entre cromátidas no hermanas de los cromosomas homólogos, fenómeno conocido como recombinación genética o meiótica. La recombinación rara vez separa dos loci que se encuentren muy cercanos en un cromosoma ya que el espacio disponible para que se dé el entrecruzamiento es muy pequeño. Por ello grupos de genes localizados en la misma región cromosómica, cuando ésta es pequeña, tienden a transmitirse juntos, en bloque a lo largo de un pedigrí y se dice que están ligados. En cambio, cuanto más separados están dos loci mayor es la probabilidad de que se de un entrecruzamiento. La probabilidad de que se de un entrecruzamiento entre dos loci se llama *fracción de recombinación* (FR). El uso de transformaciones matemáticas permite convertir los datos obtenidos de FR en distancias genéticas y en la construcción de mapas genéticos con distancias entre los distintos loci. Estas distancias se expresan en centimorgans (cM), siendo 1 cM la distancia genética en la que se produce un entrecruzamiento por cada 100 meiosis). En cuanto a correlación entre distancia física y genética se ha considerado históricamente que 1 cM es igual a 1 Mb, aunque por los últimos datos disponibles del Proyecto Genoma Humano la equivalencia es de 700 kb (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Esta medida es aproximada ya que se ha demostrado que existen regiones cromosómicas más

susceptibles a sufrir recombinación (puntos calientes de recombinación); en general es mínima en el centrómero y aumenta hacia el telómero. También es más alta en mujeres que en varones.

1.6.2.1.1.-Análisis de ligamiento

Mediante el análisis de ligamiento genético es posible disponer de un mapa genético que muestre la posición relativa de distintos loci basándose en la frecuencia de recombinación. La construcción de un mapa genético requiere de la existencia de marcadores genéticos distribuidos por toda la extensión del genoma. Los marcadores genéticos son polimorfismos del DNA o de proteínas que se heredan de forma mendeliana, variables en la población. La informatividad de un marcador viene dada por su polimorfismo midiéndose a través de la heterizigosidad (frecuencia de heterocigotos) o través del contenido de información polimórfica (P.I.C.: refleja la proporción de entrecruzamientos parentales informativos que podemos obtener con un marcador). Cuanto mayor sea la informatividad o P.I.C. de un marcador, mayor será la probabilidad de definir la fase de segregación de los alelos en una genealogía. Dentro de estos marcadores polimórficos, los más útiles son los marcadores microsatélites ya que con ellos se pueden detectar individuos heterocigotos, realizar una búsqueda de sucesos recombinantes y construir haplotipos con mayor facilidad. Los microsatélites son repeticiones cortas en tándem de dos a cinco nucleótidos que se encuentran repartidas a lo largo del genoma. Los más frecuentes son los dinucleótidos del tipo $(CA)_n$ ($[dC-dA]_n \cdot [dG-dT]_n$). Constituyen los marcadores más utilizados para localizar un determinado gen en un cromosoma o región cromosómica ya que se pueden caracterizar con gran facilidad por PCR.

El método estadístico utilizado en el análisis de ligamiento es el análisis de ligamiento bipuntual o LOD SCORE para determinar si dentro de una familia una enfermedad y los marcadores se transmiten de manera independiente o no. El LOD SCORE o Z es el logaritmo de la probabilidad relativa de que dos loci estén

ligados para una determinada fracción de recombinación θ (% de descendencia que es recombinante), calculándose como el cociente entre la probabilidad de que estén ligados siendo su fracción de recombinación θ entre 0,00 y 0,40, y la probabilidad de que no estén ligados siendo su fracción de recombinación de 0,5. La fracción de recombinación varía entre 0 (para loci que estén muy próximos) y 0,5 para loci lejanos o que se encuentren en cromosomas distintos. Por ello diremos que dos loci están ligados sólo si θ es menor de 0,5. El valor a partir del cual se considera que hay ligamiento significativo es $Z \geq 3$ (mil o más probabilidades contra una de que haya ligamiento). Un valor inferior a -2 se considera definitivo para descartar el ligamiento. Dado lo complicado que resulta hacer los cálculos para obtener los valores de las puntuaciones LOD manualmente es necesario el uso de paquetes estadísticos con programas informáticos como el LINKAGE (Ott, 1974) o sus versiones más actuales, FASTLINK 2.1, empleado en nuestros estudios (Schaffer, 1996).

1.6.2.1.2.- Cartografiado por homocigosis

En enfermedades recesivas de baja frecuencia, el cartografiado por homocigosis en familias consanguíneas (Farrall, 1993) constituye una aproximación muy útil y eficaz para refinar los datos que nos aporta el análisis de ligamiento de familias nucleares a la hora de cartografiar el gen mutante. La probabilidad de que un paciente con padres consanguíneos sea homocigoto por ascendencia para la mutación es inversamente proporcional a la frecuencia de la enfermedad en la población. Cuanto más se aproxima el coeficiente de endogamia de los padres a la tasa de portadores de la enfermedad en la población menos plausible es la hipótesis de homocigosis.

Cuando el gen causante de una enfermedad recesiva está cartografiado y se pueden construir haplotipos extensos de diversos marcadores ligados en las familias, es de esperar que los pacientes con padres emparentados sean homocigotos por ascendencia tanto para la mutación como para los haplotipos que

se encuentran en la región de ligamiento. El razonamiento inverso también es válido: dado un paciente homocigoto para un haplotipo ligado a la enfermedad, puede inferirse la homocigosidad por ascendencia para la mutación aunque la consanguinidad de los padres sea lejana o desconocida (Monros *et al.*, 1994). Por lo tanto, la observación de pérdida de homocigosidad para más de un marcador contiguo en pacientes hijos de padres consanguíneos u homocigotos por ascendencia es una forma de inferir la existencia de sucesos recombinantes anteriores o ancestrales no observables directamente en la generación actual. De este modo el cartografiado por pérdida de homocigosidad permite mapear de forma más refinada el gen respecto a los marcadores ligados, al aumentar de forma indirecta el número de meiosis estudiadas y así reducir el intervalo crítico.

1.6.2.1.3.- Genes candidatos

Los genes que se encuentran dentro de la región cromosómica crítica serán los genes candidatos, con lo hay que demostrar que están asociados a la enfermedad en cuestión. Para elegir uno de ellos respecto al resto es esencial conocer las características clínicas de la enfermedad y, sobre todo, los conocimientos fisiopatológicos que se tengan de ella.

Para que un gen candidato sea considerado la causa de una enfermedad debe demostrarse que realmente está mutado en las personas afectadas. La combinación de la información de la localización cromosómica y de genes previamente ubicados en la región crítica candidata se denomina estrategia del candidato posicional. La búsqueda de mutaciones comporta examinar muestras de DNA de un número importante de pacientes e individuos control.

1.7.- BÚSQUEDA DE MUTACIONES EN GENES RESPONSABLES DE ENFERMEDADES HUMANAS.

El estudio genético de las enfermedades hereditarias tiene como objetivo definir el tipo y la localización de la mutación genética asociada con el desarrollo

de la enfermedad. Los métodos de detección de mutaciones han ido cambiando en el transcurso de las tres últimas décadas, pudiendo diferenciar dos etapas separadas por la introducción de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El estudio de mutaciones en genes implicados en el desarrollo de enfermedades comienza en 1970, cuando se generaliza la técnica de clonación de genes. En esta etapa desempeñaron un papel fundamental el desarrollo de vectores, como los fagos y los plásmidos, que luego se multiplican en el interior de las bacterias, la caracterización de las endonucleasas de restricción, enzimas que reconocen y cortan una secuencia determinada de ADN, y la capacidad de "coser" fragmentos de ADN por acción de las ligasas de ADN. Una vez clonado el gen responsable de una determinada enfermedad se procedía a cortarlo con diferentes enzimas de restricción y a volver a clonar los fragmentos generados para proceder a su secuenciación en los individuos portadores de la enfermedad.

Aparecen también nuevos métodos que permiten detectar mutaciones en ADN clonado y no clonado sin necesidad de secuenciar. Así, la electroforesis en geles de agarosa y acrilamida permitía separar los fragmentos de ADN generados tras la digestión con endonucleasas de restricción de acuerdo con su tamaño y, tras transferirlos a una membrana de nylon o nitrocelulosa (método de *Southern blot*), se podían hibridar con sondas específicas del gen que se deseaba estudiar. De esta manera se podían caracterizar deleciones y reordenamientos génicos, así como mutaciones puntuales cuando afectaba a la secuencia reconocida por la endonucleasa de restricción. Estos métodos son muy laboriosos lo que dificulta su uso rutinario en los estudios diagnósticos.

En 1987 cambia radicalmente la metodología de diagnóstico de mutaciones con la introducción de la PCR, que permite amplificar regiones del ADN eliminando la necesidad de clonar y reclonar genes. Una vez que conocemos la secuencia de un gen, podemos diseñar oligonucleótidos que flanquean la región del ADN que queremos amplificar, así como obtener millones de copias de esa región.

Existen numerosos métodos de cribado de un panel de pacientes en busca de mutaciones en un gen determinado. Los métodos de búsqueda de mutaciones se pueden dividir en dos grandes grupos:

1.7.1.- Métodos directos de detección de mutaciones

Generalmente se emplean para detectar la presencia o ausencia de una mutación específica. Comprobar si la muestra de ADN de un paciente tiene o no un cambio de secuencia conocido es un problema diferente y mucho más sencillo que barrer un gen para comprobar si contiene alguna mutación, por ello estos métodos son muy útiles para el diagnóstico pero no en el caso de la identificación de genes candidato, dónde no se puede especificar *a priori* de qué mutación se trata. Se pueden hacer pruebas de mutaciones conocidas en los siguientes casos: enfermedades en las que se supone existe homogeneidad alélica entre los individuos afectados en una población, enfermedades en las que la mayoría de pacientes enfermos presentan una o un número limitado de mutaciones específicas, para caracterizar una mutación en un diagnóstico familiar, y en investigación para comprobar muestras de controles, ya que si existe un cambio en un paciente enfermo se debe comprobar si representa una mutación patogénica o puede ser un polimorfismo no patogénico.

1.7.1.1.- Presencia/ausencia de una diana de restricción

Los enzimas de restricción (ER) son proteínas que reconocen secuencias concretas del ADN, denominadas dianas de restricción y tienen actividad endonucleasa. Existen distintos tipos de ER según sea el tipo de secuencia reconocida y el lugar de corte. Las que tienen una aplicación más generalizada en el diagnóstico molecular son las de tipo II, que reconocen secuencias palindrómicas de entre 4 y 8 nucleótidos (secuencias que se leen igual de izquierda a derecha que de derecha a izquierda) y cortan el ADN en dicha secuencia. Las mutaciones a menudo o destruyen el sitio donde la enzima de restricción corta la secuencia normal o crean un nuevo lugar para la enzima de restricción, el cual no está presente en la secuencia de mutación. Como consecuencia de ello, tras la

Introducción

amplificación en cadena de la ADN polimerasa (PCR) a partir de la muestra de ADN genómico y tras la digestión con el enzima de restricción adecuado se puede identificar la presencia o ausencia de una mutación específica (fig.6).

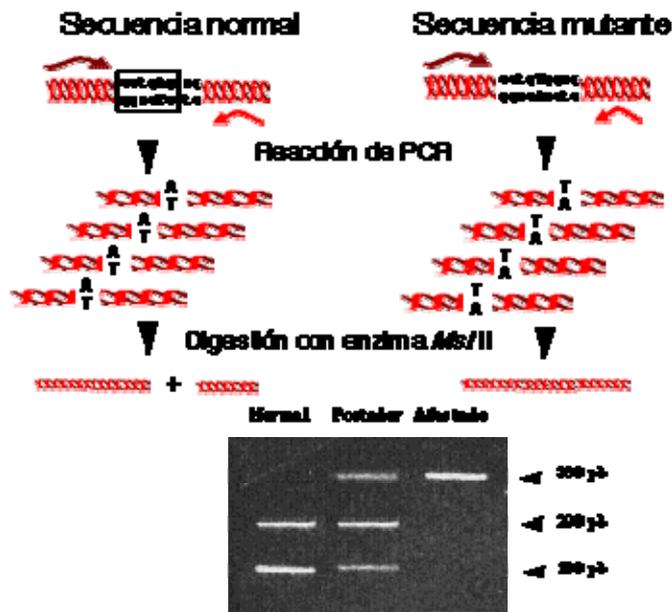


Figura 6.- Ejemplo de la detección de la mutación de anemia falciforme mediante PCR y digestión con el enzima Mst II. En el ejemplo, la secuencia normal (300pb) presenta la diana de restricción y por lo tanto después de la digestión se obtendrán dos subfragmentos, uno de 200 pb y otro de 100 pb. Contrariamente, la secuencia mutada no presenta la diana de restricción y por lo tanto la digestión no alterará su tamaño (todos continuarán siendo de 300 p). Así, en pacientes portadores heterocigotos de dicha mutación los fragmentos amplificados serán de dos clases, con la secuencia diana o sin dicha secuencia. La digestión de los primeros dará lugar a dos fragmentos de 200 y 100 pb, mientras que los segundos mantendrán el tamaño de 300 pb después de la digestión. En un paciente afectado, todos los fragmentos amplificados tendrán la secuencia que no es reconocida por el enzima y por lo tanto la digestión no alterará su tamaño (todos continuarán siendo de 300 pb). La resolución en un gel de agarosa de cada una de estas muestras se presenta en la parte inferior.

1.7.1.2.- Empleo de sondas basadas en oligonucleótidos específicos de alelo (ASO)

El método consiste en el diseño de oligonucleótidos con la secuencia correspondiente a cada uno de los alelos descritos para una o varias mutaciones específicas en un gen determinado, incluyendo como control a la secuencia normal. Cada mutación puede estar localizada en una región distinta del gen. De cada mutación se dispone de la secuencia y de cebadores que permiten amplificar el exón correspondiente. Después de obtener ADN de cada uno de los pacientes, mediante los cebadores apropiados se realiza una PCR para cada exón. Esta reacción se realiza en un solo tubo de forma que se obtiene una mezcla de todos los exones amplificados. La muestra así obtenida se aplica por duplicado a un filtro de nylon y el ADN se fija mediante luz UV. Seguidamente el filtro se hibrida con el ASO correspondiente a cada mutación y a su control normal, marcados previamente de forma enzimática, con fluorescencia o radioactividad. Después del revelado apropiado obtendremos una señal positiva que revelará los alelos presentes en cada paciente (fig. 7).

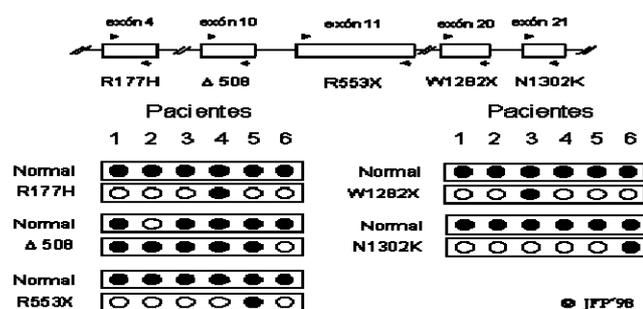


Figura 7.- Ejemplo de la detección de mutaciones en el gen de la fibrosis quística mediante oligonucleótidos específicos de alelo. En el ejemplo, el paciente 1 es heterocigoto para la mutación Δ508, pues da positivo para el ASO del alelo normal de todas las mutaciones y también para el ASO del alelo Δ508. El paciente 2 es homocigoto para la mutación Δ508, pues en el filtro de dicha mutación solo obtenemos señal positiva para el ASO del alelo Δ508. Los pacientes 3, 4 y 5 son heterocigotos compuestos para las mutaciones Δ508 - W1282X, Δ508 - R177H y Δ508 - R553X respectivamente. Finalmente el paciente 6 es también heterocigoto en este caso para la mutación N1302K.

Introducción

1.7.1.3.- Prueba ARMS: amplificación por PCR basada en cebadores específicos de alelo

Se llevan a cabo reacciones apareadas de PCR. Uno de los cebadores (el cebador común) es el mismo en las dos reacciones, mientras que el segundo cebador de cada reacción presenta versiones sutilmente diferentes, una específica de la secuencia normal y la otra específica de la secuencia mutante. Normalmente, se incluye un par de cebadores control, destinados a amplificar una secuencia no relacionada pero presente en todas las muestras, lo que permite comprobar que la reacción de PCR ha funcionado bien. El cebador común puede escogerse de manera que el producto obtenido tenga el tamaño que se desee, de forma que resulta sencillo diseñar reacciones múltiples, que permiten la detección simultánea de varios productos de PCR utilizando varios pares de cebadores a la vez. En estos sistemas no es necesario introducir un par adicional de control, ya que los cebadores específicos de la secuencia normal y de la mutante se pueden combinar para asegurar que todos los tubos den algún producto de amplificación. El método ARMS es adecuado para el cribado de muchas muestras en busca de un panel de mutaciones determinado empleando PCR múltiple (fig. 8).

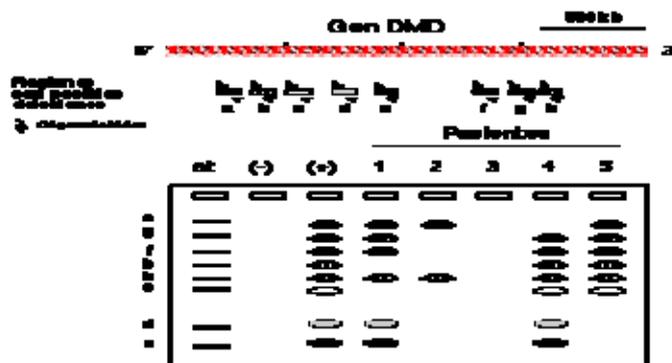


Figura 8.- Ejemplo de una PCR múltiple para la detección de mutaciones por delección en el locus DMD. Utilizando los oligonucleótidos indicados en la parte superior de la figura se amplifican, en una sola reacción, distintos exones del gen DMD. Los primeros carriles corresponden a controles, un estándar de fragmentos amplificados, un control negativo de la PCR en el cual no se añade ADN y un control positivo de un individuo con el alelo normal. De 1 a 5 son varones afectados de DMD. El paciente 1 presenta una delección de los exones b y c. El paciente 2 presenta una delección desde el exón b al exón g. El paciente 3 presenta una delección de toda la región analizada. El paciente 4 tiene deleccionado el exón a y finalmente el paciente 5 ha perdido los exones d y e.

1.7.1.4.- Ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA)

La prueba OLA se basa en dos oligonucleótidos, diseñados para hibridar con secuencias adyacentes, y que coinciden en la posición de la mutación. La ADN ligasa unirá covalentemente a los dos oligonucleótidos solamente cuando la hibridación con el molde sea perfecta. La prueba se realiza sobre un molde amplificado por PCR, y sólo se realiza una reacción de ligación. Uno de los oligos está etiquetado con biotina, mientras que el segundo lleva una molécula informadora como digoxigenina. Los productos de reacción se transfieren a placas de microtitulación revestidas de estreptoavidina, que se una a la biotina. Si existe ligación la molécula informadora también quedará retenida en el pocillo después de los lavados (fig. 9). La técnica de ligación de oligonucleótidos es un método particularmente útil para la detección de anomalías genéticas específicas como son: las mutaciones puntuales, las deleciones y los cambios estructurales. La eficiencia de este sistema ha sido demostrada en diferentes enfermedades (anemia de células falciformes, fibrosis quística). La sensibilidad de la prueba puede ser mejorada asociando la ligación de oligonucleótidos con la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR.

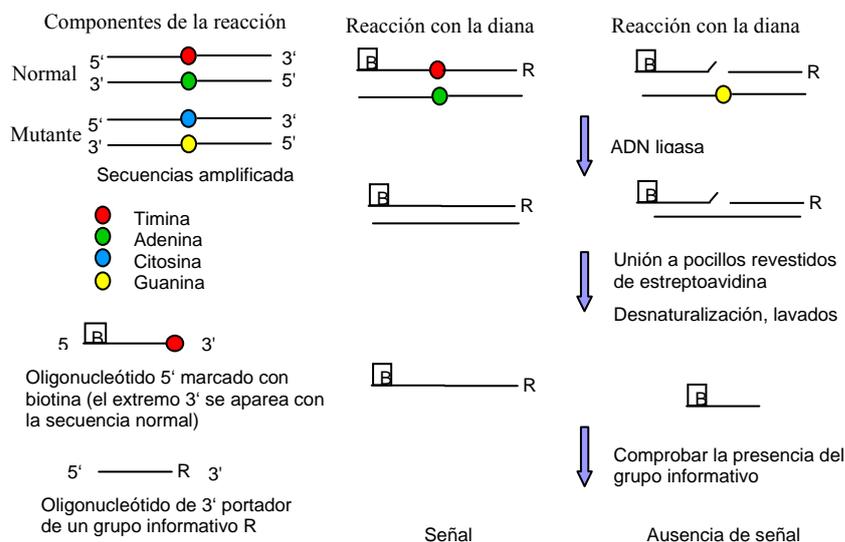


Figura 9.- Ensayo de ligación de oligonucleótidos.

1.7.1.5.- Secuenciación directa del ADN

Existen dos métodos de secuenciación de los ácidos nucleicos. Uno de ellos (Maxam y Gilbert) utiliza reactivos químicos a fin de cortar el ADN a nivel de bases específicas. El otro se denomina enzimático, de terminación en cadena o dideoxi (Sanger, Nicklen y Coulson). El fin de ambos es conseguir la secuencia completa de cada una de las bases que constituyen un fragmento de ácido nucleico.

En el método químico un fragmento de ADN se marca en uno de sus extremos con P o S radiactivo por acción de la enzima polinucleótido quinasa. Ambos extremos se separan por la acción de una enzima de restricción. El paso siguiente consiste en romper estos fragmentos, no más de una o dos veces por molécula, con reacciones químicas específicas para cada una de las cuatro bases. Haremos cuatro alícuotas y trataremos cada una de ellas con un compuesto químico que modifique una de las cuatro bases, aproximadamente una vez por molécula de ADN. El tratamiento posterior con piperidina producirá la rotura de la cadena allí donde la base había sido alterada.

El método enzimático es el más utilizado en la actualidad. Se prepara un ADN circular lineal (clonando en el fago M13). Se introduce un cebador que va a servir para el inicio de la síntesis del ADN que vamos a marcar y a secuenciar. El cebador es específico a una secuencia complementaria del fago M13. Una polimerasa (enzima de Klenow) se encarga de polimerizar. Se establecen cuatro alícuotas. La síntesis se lleva a cabo en dos pasos: en la primera parte del proceso el cebador se alarga unos cientos de nucleótidos utilizando para ello los cuatro nucleótidos, pero uno de ellos está marcado. En el segundo paso se produce la terminación de las cadenas por la adición de una pequeña cantidad de un dideoxinucleótido distinto en cada alícuota. El dideoxido es un nucleótido trifosfato que por carecer de grupos OH tanto en el carbono 2' como el 3' de la ribosa lo que imposibilita el crecimiento de la cadena paraliza la síntesis. El resultado en cada tubo de ensayo es una colección de fragmentos, de tantos tamaños como unidades de la base existan en la secuencia. Los distintos

fragmentos se analizan por electroforesis en geles de acrilamida. Actualmente para el marcaje se utilizan cuatro fluorocromos distintos: fluoresceína, NBD (4-cloro-7nitrobenzeno-2oxal-diazol), tetrametilrodamina y rojo texas, uno para cada base. Una vez conjugados a cuatro alícuotas del cebador, se procede a la extensión del iniciador e interrupción con dideoxis. La detección de mutaciones se realiza a partir de la lectura de los electroforegramas obtenidos tras la secuenciación directa y comparándolas con la secuencia normal.

1.7.2.- Métodos indirectos o de cribado de mutaciones

Estos métodos se emplean cuando no se sabe si el gen está mutado o no, ni en qué región del gen se localiza la mutación. Las distintas estrategias de detección de nuevas mutaciones pueden ser agrupadas en tres grandes apartados: 1) detección de variaciones en el apareamiento entre las cadenas "normal" y mutada, 2) detección de cambios de conformación y 3) detección de productos génicos alterados (Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics 3. Oxford: GARLAND PUBLISHING BIOS Scientific Publishers, 1999).

1.7.2.1.- Detección de variaciones en el apareamiento entre las cadenas "normal" y mutada.

En este grupo se incluyen dos métodos ampliamente utilizados como son el análisis de heteroduplex (fig.10) y la digestión química de cadenas con apareamientos erróneos (CCM, del inglés "*chemical cleavage of mismatch*"). En ambos métodos el cambio o mutación se detecta mediante la hibridación en solución de la cadena normal (N) y la cadena mutada (m) obtenidas previamente mediante PCR. Moléculas de ADN que corresponden a la secuencia de la cadena mutada (mm) se mezclan con moléculas de ADN que corresponden a la secuencia de la cadena normal (NN). Después de la desnaturalización por calor de ambas cadenas se permite su renaturalización. Si existe alguna diferencia en la secuencia de nucleótidos entre ambos tipos de cadenas, además de los híbridos NN y mm (homoduplex), también se formarán híbridos del tipo Nm (heteroduplex) que

Introducción

presentarán errores de apareamiento. En el método de heteroduplex los híbridos se analizan en un gel de acrilamida y las diferencias entre ellos se visualizan por la aparición de un patrón de bandas anómalo. En el método CCM los híbridos son tratados con un reactivo químico (por ejemplo tetróxido de osmio) que cortan a la doble cadena de ADN en regiones de apareamiento erróneo. La aparición de fragmentos de degradación será indicación de la existencia de una variación entre la cadena normal y la mutada.

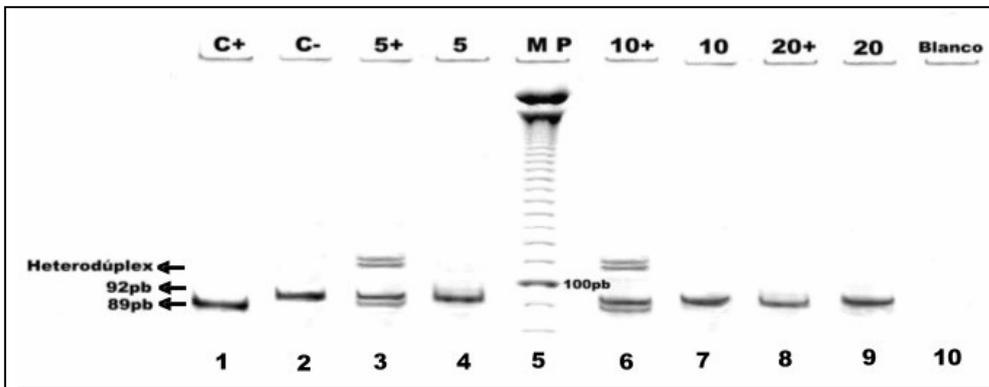


Figura 10. Ejemplo de la técnica PCR-heterodúplex por agrupamiento para la detección de la mutación F508del causante de la fibrosis quística. Línea 1: control positivo, homocigoto para F508del (89pb); Línea 2: control negativo, homocigoto para el alelo normal (92pb); Línea 3: agrupamiento de cinco muestras más un heterocigoto (5+); Línea 4: agrupamiento de cinco muestras (5); Línea 5: marcador de peso molecular de 10pb; Línea 6: agrupamiento de 10 muestras más un heterocigoto (10+); Línea 7: agrupamiento de diez muestras (10); Línea 8: agrupamiento de 20 muestras más un heterocigoto (20+); Línea 9: agrupamiento de 20 muestras; Línea 10: blanco de reactivos.

1.7.2.2.- Detección de cambios de conformación.

De los métodos de análisis de cambios de conformación, destaca por su versatilidad, economía y aceptación generalizada el análisis de conformación de cadena sencilla (SSCP, del inglés "single-strand conformation polymorphism") (fig.11). El método SSCP se fundamenta en los cambios de conformación que presentan dos cadenas sencillas de ADN que difieren entre sí en un único nucleótido. Dichos cambios de conformación se pueden poner de manifiesto en un gel de acrilamida por la aparición de un patrón de bandas diferencial. El método es

muy resolutivo y su aplicación es técnicamente simple. Algunas de las limitaciones de la técnica son: las condiciones de la electroforesis (temperatura y concentración de aditivos como glicerol o sacarosa) deben ser determinadas empíricamente, el tamaño de la molécula a analizar no puede exceder los 300-350 pb y presenta una sensibilidad inferior al 100%. A pesar de estas limitaciones es una técnica ampliamente utilizada como primera aproximación al estudio y caracterización de nuevas mutaciones. Su aplicación en la detección rutinaria de nuevas mutaciones consiste básicamente en amplificar mediante PCR fragmentos de 300-350 pb del locus a estudiar. Los productos de amplificación se desnaturalizan por calor y se analizan en un gel de acrilamida juntamente con un control de secuencia normal. La aparición de un patrón de bandas anómalo es indicativo de un posible cambio nucleotídico. Dicho cambio será posteriormente confirmado mediante la secuenciación del fragmento cuyo patrón se ha visto alterado.

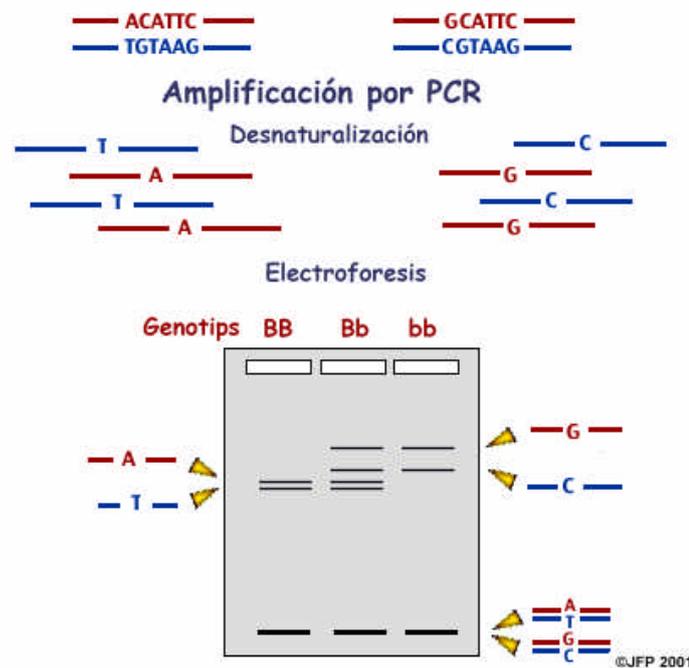


Figura 11.- Esquema de la detección de variantes polimórficas mediante PCR y polimorfismo de cadena sencilla (SSCP).

1.7.2.3.- Detección de productos génicos alterados.

Como modelo de los métodos basados en el estudio de modificaciones en el producto génico está el test de proteína truncada (PTT, del inglés "protein truncation test"). El test PTT es un método de reciente aplicación diseñado de forma específica para detectar mutaciones que causan la aparición de un codón de paro prematuro en la molécula de ADN. Es un método técnicamente complejo, muy sensible para este tipo de mutaciones pero inaplicable para la detección de otro tipo de variaciones del ADN.

El método consiste en la amplificación mediante PCR de distintas regiones del locus a analizar, utilizando cebadores que además de contener la secuencia homóloga del fragmento a amplificar contienen en pauta de lectura, la secuencia del lugar de iniciación de la transcripción para la ARN polimerasa de T7 y un codón ATG de iniciación. Los fragmentos amplificados se utilizan como moldes en una reacción de transcripción in vitro utilizando la ARN polimerasa de T7. Así se obtienen moléculas de ARN que son simultáneamente traducidas a proteína en presencia de un aminoácido marcado. Las proteínas obtenidas son analizadas en un gel de acrilamida-SDS que permite detectar su tamaño. La aparición de proteínas con un tamaño inferior al esperado respecto a un control de secuencia normal, será indicativo de la existencia de una mutación de codón de paro prematuro en la molécula analizada.

Estos métodos de *screening* de tipo físico, químico y biológico para detectar mutaciones, tales como el análisis conformacional de cadena sencilla (SSCP), electroforesis de heterodúplex en gel y electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) poseen una buena especificidad, fallando desgraciadamente en cuanto a la sensibilidad. Por tanto, un método ideal para el *screening* debe poseer elevada sensibilidad, no presentar interferencias para ciertas mutaciones, estar automatizado y ofrecer un alto rendimiento en el procesamiento de la muestra. El DHPLC, desarrollado en 1995, que actualmente se está

empleando como método indirecto de búsqueda de mutaciones resuelve todos estos criterios. El DHPLC detecta mutaciones según los homodúplex o heterodúplex que se forman del fragmento estudiado.

2.- Objetivos

El objetivo de esta tesis doctoral es profundizar en el conocimiento de las bases genéticas y moleculares de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, especialmente de las formas con herencia autosómica recesiva. En ese sentido nos planteamos los siguientes objetivos:

1.- Análisis genético y molecular del gen *GDAP1*, en una serie de 118 familias diagnosticadas con la enfermedad de CMT, tanto formas desmielinizantes como axonales, y patrones de herencia dominantes y recesivos, en las cuales se habían excluido previamente mutaciones en los genes *PMZ*, *PMP22* y *GJB1*. Este análisis ha constado de tres partes:

1.a) Análisis de cribado y detección de mutaciones en el gen *GDAP1*.

1.b) Construcción de haplotipos para determinar la posible existencia de un efecto fundador de la mutación más frecuente en nuestra serie de estudio, p.Q163X, y el origen de esa mutación en pacientes procedentes de diferentes países.

1.c) Análisis de cribado y detección de mutaciones en el gen *GDAP1L1* como posible gen candidato, seleccionado por su similitud de secuencia con respecto al gen *GDAP1*, en las 107 familias en las cuales no se encontró mutación en *GDAP1*.

2.- Estudio genético y molecular de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth en 17 familias de etnia gitana, con herencia autosómica recesiva y neuropatía desmielinizante.

3.- Material y Métodos

3.1.- PACIENTES

3.1.1- Análisis genético del gen *GDAP1*

Estudiamos un total de 129 pacientes pertenecientes a 118 familias, diagnosticados con la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, que fueron remitidas a nuestro laboratorio por neurólogos y/o genetistas de diferentes hospitales de la península ibérica para el análisis genético del gen *GDAP1*. La serie de estudio se distribuye de la siguiente forma: 91 casos esporádicos, 17 familias con herencia autosómica recesiva y 10 familias que no presentaban un patrón de herencia claro y no se podía descartar o era compatible con un patrón de herencia dominante. Se observó consanguinidad en 10 casos esporádicos y 5 familias. En 94 de las 118 familias habían sido excluidas mutaciones en los genes *PMP22*, *MPZ* y *GJB1*.

El diagnóstico de la enfermedad en estas 118 familias se realizó mediante estudios clínicos, electrofisiológicos y en ocasiones anatomopatológicos.

Todas las muestras humanas utilizadas en este estudio se obtuvieron con el consentimiento informado de los enfermos y familiares, y siguiendo las normas de actuación ética de los siguientes hospitales: Hospital Universitario La Fe (Valencia), Hospital de Donostia (San Sebastián), Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Cantabria), Fundación Jiménez Díaz y Hospital Ramón y Cajal (Madrid), Hospital San Francisco de Asís y Hospital Miguel Servet (Zaragoza), Hospital Joan de Déu (Barcelona), Hospital de Mérida (Mérida).

3.1.2.- Construcción de haplotipos

Construimos haplotipos en 10 familias de nuestra serie de estudio, 8 casos esporádicos con herencia autosómica recesiva y 2 familias con herencia autosómica dominante para las mutaciones más recurrentes en el análisis genético del gen *GDAP1*, todas ellas de origen español (fig.12 y fig.13).

Material y métodos

Para este estudio además, utilizamos 3 familias de origen español, LF38, LF249 y LF20, cuyo análisis de mutaciones y descripciones clínicas habían sido previamente descritas (Cuesta *et al.*, 2002; Sevilla *et al.*, 2003), así como 3 familias, HOU1363, HOU726, HOU364, americanas pero de origen hispano (una de Perú y dos de Costa Rica, respectivamente), cuyo análisis de mutaciones y datos clínicos habían sido descritos anteriormente (Boerkoel *et al.*, 2003).

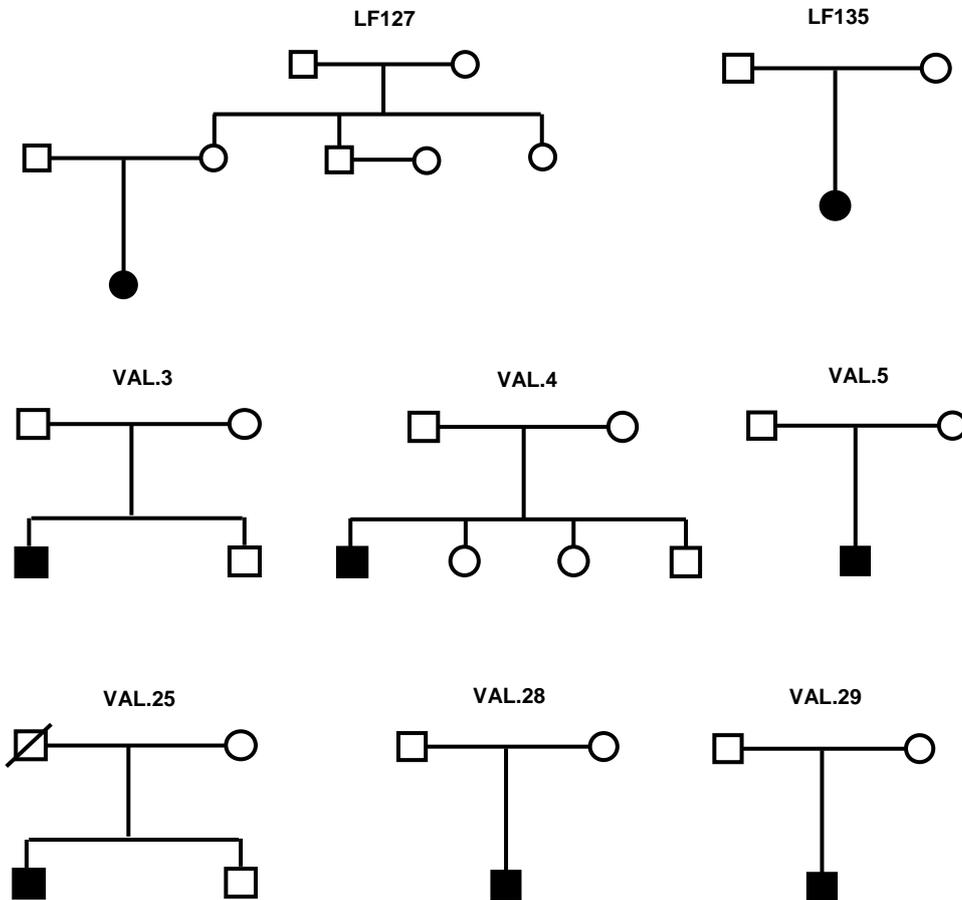


Figura 12.- Árboles genealógicos de los 8 casos esporádicos con ARCMT utilizadas en este estudio. La simbología usada es la siguiente: ■ varón enfermo, ● mujer enferma, □ varón sano, ○ mujer sana.

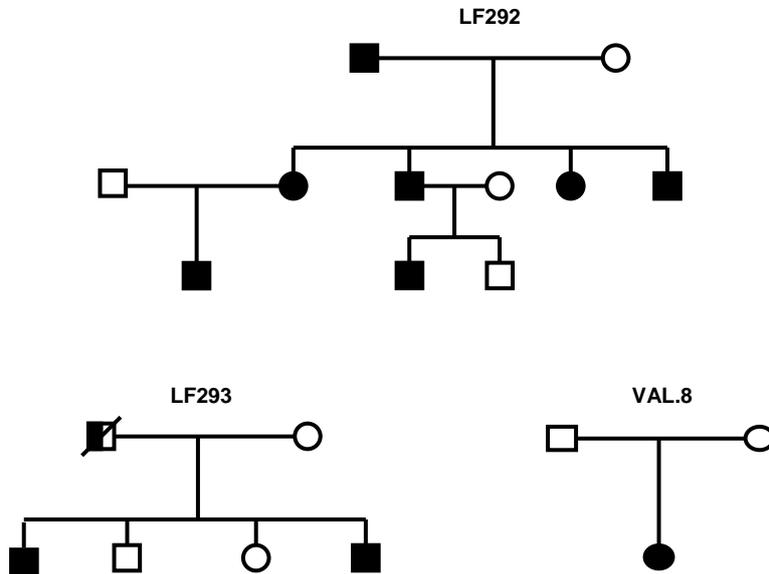


Figura 13.- Árboles genealógicos de las 2 familias y un caso esporádico con CMT autosómico dominante utilizadas en este estudio. La simbología usada es la siguiente: ■ varón enfermo, ● mujer enferma, □ varón sano, ○ mujer sana.

3.1.3- Análisis genético del gen *PMP2*

Estudiamos un total de 10 pacientes pertenecientes a 2 familias y un caso esporádico diagnosticados con la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, en los que habíamos encontrado una única mutación en el gen *GDAP1* (fig.13).

Las muestras humanas utilizadas en este estudio se obtuvieron con el consentimiento informado de los enfermos y familiares, y siguiendo las normas de actuación ética de los siguientes hospitales: Hospital Universitario La Fe (Valencia) y Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Cantabria).

3.1.4- Exclusión del gen *GDAP1L1* como posible gen candidato

Estudiamos un total de 117 pacientes pertenecientes a 107 familias diagnosticados con la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, sin distinguir entre formas desmielinizantes y/o axonales, cuyo análisis genético de los genes *PMP22*,

Material y métodos

MPZ, *GJB1* y *GDAP1* había sido excluido. La serie se distribuye como sigue: 81 casos esporádicos, 17 familias con herencia autosómica recesiva y 7 familias con herencia autosómica dominante. La consanguinidad estaba presente en 9 casos esporádicos y en 5 familias.

Todas las muestras humanas utilizadas en este estudio se obtuvieron con el consentimiento informado de los enfermos y familiares, y siguiendo las normas de actuación ética de los siguientes hospitales: Hospital Universitario La Fe (Valencia), Hospital de Donostia (San Sebastián), Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Cantabria), Fundación Jiménez Díaz y Hospital Ramón y Cajal (Madrid), Hospital San Francisco de Asís y Hospital Miguel Servet (Zaragoza), Hospital Joan de Déu (Barcelona), Hospital de Mérida (Mérida).

3.1.5.- CMT autosómico recesivo en población gitana

Una serie de 8 familias con CMT, con un total de 20 individuos afectados, fueron seleccionadas para nuestro estudio en base a los siguientes criterios diagnósticos: (i) neuropatía sensitivo-motora de aparición en la 1ª o 2ª década de vida, (ii) ausencia de síntomas clínicos y electrofisiológicos en los padres, (iii) consanguinidad parental o al menos más de un individuo afecto. Incluimos en este estudio, 9 casos esporádicos que presentaban idéntica patología, nacidos de padres no consanguíneos en 5 de los casos estudiados.

Todos los pacientes, un total de 29, fueron diagnosticados con una neuropatía sensitivo-motora desmielinizante con un patrón de herencia autosómico recesivo. Todos ellos de etnia gitana (fig.14 y fig.15).

El diagnóstico de la enfermedad fue realizado mediante análisis clínicos electrofisiológicos y en algunos casos anatomopatológicos, por neurólogos y/o genetistas de los Centros: Hospital Universitario La Fe (Valencia), Fundación Jiménez Díaz (Madrid), Hospital La Paz (Madrid), Hospital Virgen del Rocío (Sevilla) y Hospital Virgen de las Nieves (Granada).

Todas las muestras utilizadas para nuestro estudio se obtuvieron con el consentimiento informado de los enfermos y familiares siguiendo las normas de actuación ética de los Hospitales o Centros mencionados anteriormente.

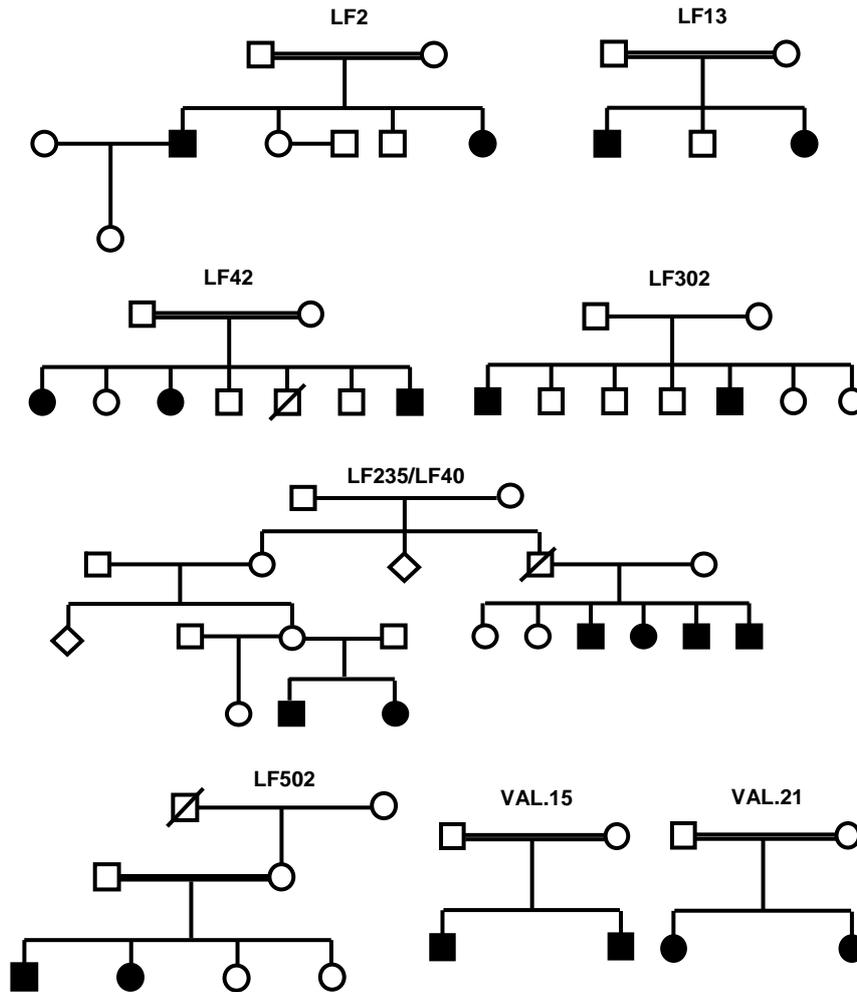


Figura 14.- Árboles genealógicos de las 8 familias con ARCMT y neuropatía desmielinizante utilizadas en este estudio. La simbología usada es la siguiente: ■ varón enfermo, ● mujer enferma, □ varón sano, ○ mujer sana.

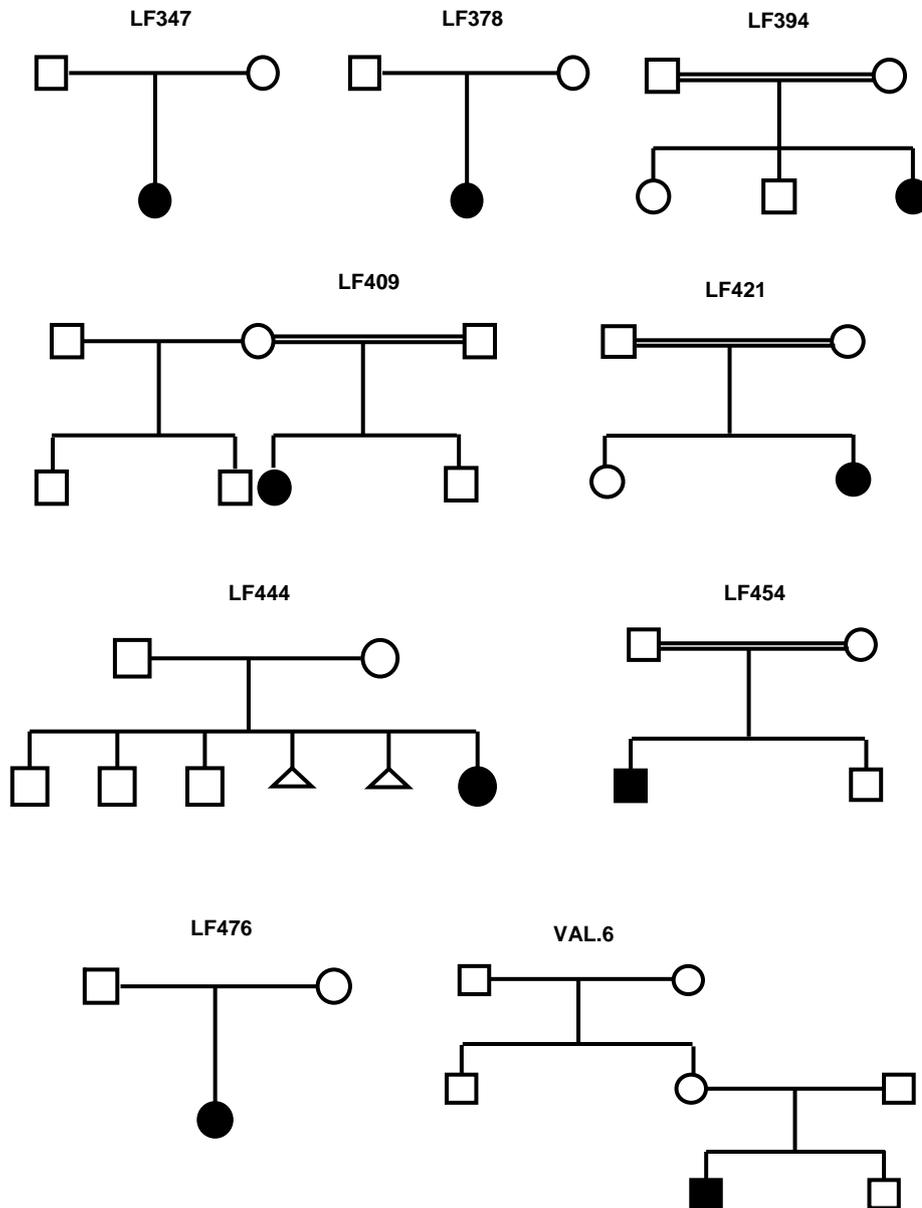


Figura 15.- Árboles genealógicos de los 9 casos esporádicos con CMT-AR y neuropatía desmielinizante utilizados en este estudio. La simbología usada es la siguiente: ■ varón enfermo, ● mujer enferma, □ varón sano, ○ mujer sana.

3.2.- EXTRACCIÓN DEL ADN

El ADN genómico de cada uno de los pacientes analizados se obtuvo a partir de 10-20 ml de sangre periférica. La extracción del ADN se realizó según el método clásico de digestión enzimática con proteinasa K y purificación con una mezcla de fenol:cloroformo:isoamílico, seguido de precipitación con etanol (Kunkel *et al.*, 1982).

3.3.- ANÁLISIS DE MUTACIONES EN LOS GENES *GDAP1*, *PMP2* y *GDAP1L1*

3.3.1.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los 6 exones que constituyen el gen *GDAP1* se amplificaron a partir del ADN genómico utilizando cebadores específicos derivados de los extremos 5' y 3' de las secuencias intrón-exón (tabla 6). Las condiciones empleadas en las PCRs fueron las siguientes: una etapa inicial de desnaturalización a 94°C/4 min seguido de un programa de 35 ciclos que consiste en una desnaturalización inicial de 94°C/30 s, una hibridación y elongación entre 54-69°C/30 s (tabla 6), y una extensión final de 72°C durante 7 min.

Los 6 exones del gen *GDAP1L1* se amplificaron a partir de DNA genómico utilizando cebadores específicos derivados de los extremos 5' y 3' de las secuencias intron-exón (tabla 7). Las condiciones empleadas en las PCRs fueron las siguientes: una etapa inicial de desnaturalización a 94°C/5 min seguido de un programa de 35 ciclos que consiste en una desnaturalización inicial de 94°C/30 s, una hibridación y elongación entre 59-64°C/30 s (tabla 7), y una extensión final de 72°C durante 7 min.

Los 4 exones del gen *PMP2* se amplificaron a partir de ADN genómico, sólo para las familias LF292, LF293 y VAL.8 con CMT autosómico dominante, utilizando cebadores específicos derivados de los extremos 5' y 3' de las secuencias intron-exón (tabla 8). Las condiciones empleadas en las PCRs fueron las siguientes: una etapa inicial de desnaturalización a 94°C/5 min seguido de un

Material y métodos

programa de 30 ciclos que consiste en una desnaturalización inicial de 94°C/1 min, una hibridación y elongación entre 55-59°C/45 s (tabla 8), y una extensión final de 72°C durante 5 min.

Tabla 6.- Cebadores utilizados para amplificar los 6 exones del gen *GDAP1*.

Nombre	Cebador 5'→3'	T ^a de Hibridación
Exón 1	GCCCTTCATAACCAGGGTCTC *CGCCCTCCTTCCGGCAGGTACC GCCCGATCCGCGCCACCCTCCG	68°
Exón 2	GGCTGCTTAGCGGTGTCCAGGG GGGAACACATAGTTGTGTTG	55°
Exón 3	GCTTTTGAGTGTAACAACATCATG GACCATGAGACATGCTAGGTC	60°
Exón 4	CAGGGTAAGCCCAAGGCAGAG GTAGAACATTTACTCCGTGCAG	54°
Exón 5	GGCTGAACTCTGTAAGAATTTG GACCTAAGAATGTTCCCATG	60°
Exón 6	GAGACCACTGATACCAGCTGG CAGAGAGCCACGGCAATCAC	69°

*Cebador directo que da lugar a un amplicón de menor tamaño para el exón1 del gen *GDAP1*

Tabla 7.- Cebadores utilizados para amplificar los 6 exones del gen *GDAP1L1*.

Nombre	Cebador 5'→3'	T ^a de Hibridación
Exón 1	CGGAGCCTCCTTCTTTCCT CTCCCCTCCCAAGCTTCCT	61°
Exón 2	TGGGCAGAGTGTCCTGTGTC TGAGGATCTGTGGTATGGAG	61°
Exón 3	CAGGTGCCCTCTGGCCT ATCCTTTGGAAGAAAGGAGC	61°
Exón 4	AGGTATCAGAGGGATGGGACCTTT CTCGTAGGGAAGGGACTCA	64°
Exón 5	GAGGCCAACTCAGCTTCTCTT AAGAGTAGGCTGGGTGGGCT	64°
Exón 6	GTGTGTTAGGGGAGGCTGAT AGAGACACCGACAGTCAGAC	59°

Tabla 8.- Cebadores utilizados para amplificar los 4 exones del gen *PMP2*.

Nombre	Cebador 5'→3'	T^a de Hibridación
Exón 1	ATCTGAGTCTTCTGAATCCC TAGATGAAAATGTCATGTAGC	55°C
Exón 2	TTTGGCTATGCTCTCTTGGTC TCTCTCTCAAGCAGCCCAC	59°C
Exón 3	AAAGGAGTGACCTCCTGAG AGCATTATTTCTCTATTTAGAAG	55°C
Exón 4	TGGTTTGAAGCTTGAGATACTC AGTTTAGGCCTTTGCATATCTG	55°C

3.3.2.- SSCP

El rastreo de mutaciones en los genes *GDAP1*, *PMP2* y *GDAP1L1* se realizó mediante la técnica de los SSCPs (*single strand conformation polymorphism* (Orita *et al.*, 1989). Esta técnica presenta un elevado poder de resolución y permite separar fragmentos de ADN (5-500 pb) que difieren entre sí tan sólo en un par de bases. La migración de los fragmentos de ADN en un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes depende tanto de su tamaño como de la estructura que adoptan las hebras de ADN de cadena sencilla que se pliegan sobre sí mismas en función de su secuencia; un cambio en la secuencia de una sola base puede adoptar una estructura diferente respecto a la secuencia sin cambios, y por tanto dar lugar a un patrón de movilidad electroforética distinto. La electroforesis de los fragmentos de PCR se llevó a cabo en geles de poliacrilamida:bisacrilamida (29:1) al 12%, con o sin glicerol (5%), a T^a ambiente y a 800 voltios durante 16 horas. La detección de los geles se realizó mediante tinción con plata siguiendo el protocolo descrito por (Monrós *et al.*, 1996; Bort *et al.*, 1997).

3.3.3.- Análisis de restricción

La detección de la mutación p.Q163X (c.487C>T), localizada en el exón 4 del gen *GDAP1*, se realizó mediante la digestión del producto de PCR amplificado con el enzima de restricción *BsuRI* (*HaeIII*). Se tomaron 10µl del producto de PCR, 5µl del tampón recomendado por la casa comercial, 5U de enzima y la cantidad necesaria de H₂O para completar hasta un volumen final de 50µl. Los tubos de digestión se dejaron a 37°C en el baño seco durante toda la noche (4-24 horas). Los productos se analizaron en un gel de poliacrilamida al 12% durante 4 horas. La detección del gel se realizó mediante tinción con plata.

3.3.4.- Secuenciación de ADN

La secuenciación de los fragmentos de PCR de interés purificados (QIAEX II Gel Extraction Kit, QIAGEN) se realizó con un secuenciador automático ABI PRISM 3100 utilizando dideoxinucleótidos marcados fluorescentemente y uno de los cebadores de la reacción de PCR. Todas las secuencias se determinaron para ambas cadenas y fueron analizadas con el programa de análisis Chromas, version Chromas 161.

3.4.- ESTUDIO DE HAPLOTIPOS

Construimos haplotipos para las mutaciones más recurrentes en nuestra serie de estudio, utilizando 6 marcadores microsatélites, D8S279, D8S286, D8S551, D8S1474, D8S1829 Y D8S84, ligados al locus CMT4A y 1 SNP intragénico c.507T/G. Su localización física en el cromosoma 8q21.1 es: cen_D8S279-D8S286-D8S551-c.507T/G-D8S1474-D8S1829-D8S84_tel. También se analizaron 2 SNPs, rs1025928 y rs959424 próximos al locus del marcador microsatélite D8S279 para las 8 familias con CMT autosómico recesivo portadoras todas ellas de la mutación p.Q163X (c.487C>T), bien en homocigosis u hererocigosis.

El genotipado para los 6 marcadores microsatélites se realizó siguiendo el siguiente protocolo de PCR: una etapa inicial de desnaturalización a 94°C/4 min, seguido de un programa de 35 ciclos con una etapa de desnaturalización inicial de 94°C/30 s, una etapa de hibridación y elongación a 55°C (D8S279, D8S286, D8S551) o a 58°C (D8S1474, D8S1829, D8S84), y una etapa de extensión final a 72°C/7 min. Los productos de PCR fueron analizados en geles de poliacilamida no-desnatulizantes al 12% a T^a ambiente, entre 8-12 horas en función del tamaño del alelo estimado para cada marcador microsatélite y a 800 voltios. Todos los fragmentos alélicos fueron visualizados mediante la tinción con plata.

El número y tamaño de los alelos para todos los marcadores microsatélites analizados excepto los pertenecientes al marcador D8S1474 fueron establecidos según la base de datos del genoma (Genome Database, <http://www.gdb.org>) (Tabla 9).

Tabla 9.- Información de los marcadores microsatélites ligados al locus CMT4A

Nombre	Max Heter	Cebadores 5'→3'	Tamaño
D8S279	0.8790	AAACACAGGTCTGTAGGATTTTAGT GTGTCAGGTCGGGGTG	229-257 bps
D8S286	0.8217	GCTGTTTATTTGCCCATGT GCATGAAACTGTCACTGAGA	220-238 bps
D8S551	0.6600	CCACAAAGGACTTTCAGTTACG ACAGTTACCAAGACATTATAGGCAC	253-285 bps
D8S1474	*ND	AGGAATGAGCAAGGACACCT AATCAAAATAGCTAGAAGAATTGC	179-180 bps
D8S1829	0.6406	AGCTTCGATCAACCTTTTAA CGTCAATCAATCAATCAATC	101-117 bps
D8S84	0.6275	CGAAAGTTCAGAGATTTGCA ACATTAGGATTAGCTGTGGA	181-185 bps

ND = no disponible en la base de datos: GDB (Genome Data Base), <http://www.gdb.org>.

Material y métodos

El tamaño de los alelos para el marcador D8S1474 se obtuvo mediante la secuenciación de los fragmentos de PCR purificados (QIAEX II Gel Extraction Kit, QIAGEN), de aquellos individuos homocigotos para cada uno de los alelos analizados, con un secuenciador automático ABI PRISM 3100 utilizando dideoxinucleótidos marcados fluorescentemente y uno de los cebadores de la reacción de PCR. Las secuencias fueron analizadas con el programa de análisis Chromas 161. De este modo, también se establecieron las frecuencias alélicas para el marcador D8S1474 de la población general española.

La determinación de la fase del haplotipo se estableció bien por homocigosidad o por el análisis de las muestras parentales, lo cual nos permitió definir total o parcialmente la fase.

El análisis del SNP (*single nucleotide polymorphism*) intragénico c.507T/G se realizó por la amplificación por PCR del exón 4 del gen *GDAP1* y posterior digestión del producto de PCR con el enzima de digestión *DdeI*. Se tomaron 7µl del producto de PCR, 2.5µl del tampón recomendado por la casa comercial, 1U de enzima y la cantidad de H₂O necesaria para completar un volumen final de 25µl. Tras permanecer los tubos de digestión 1 hora en el baño seco a 37°C, los productos digeridos se analizaron en un gel de poliacrilamida al 12%, a T^a ambiente durante 4-5 horas y a 200 voltios. La presencia de 2 bandas de 168 pb y 120 pb indica la presencia del alelo T, mientras que la presencia de una banda de 288 pb indica la presencia del alelo G, que fueron visualizadas tras la tinción con plata.

El análisis de los SNPs rs1025928 y rs959424 se determinó tras la amplificación por PCR a partir de ADN genómico de las muestras de interés utilizando cebadores específicos derivados de los extremos 5'→3' (tabla 10), cuya información se obtuvo de la base de datos: UCSC Human Genome Browser, Genome Working Draft, <http://genome.ucsc.edu/goldenPath/septTracks.html>.

La detección se realizó mediante la técnica de los SSCPs en geles de pliacrilamida:bisacrilamida (29:1) al 12% y posterior visualización mediante la tinción con plata.

Tabla 10.- Información de los SNPs ligados al locus del marcador microsatélite D8S279.

SNP	Heter.	Frecuencia alélica	Localización física	Cebadores 5'→3'
rs 1025928	0.443	C=0.670	73125812 pb	ATGTAGACATTCATCCCATCTG
		N=0.330		AAAAGAAGATATAGTCCCAGC
rs 959424	0.121	C=0.935	73152107 pb	TAGCTGGAAAGGGTCACTAAG
		N=0.065		AATGTCAGTGGGGTAGAGAAG

La exclusión de falsa paternidad se analizó en la familia VAL.8, cuyo estudio se realizó utilizando 10 marcadores microsatélites con alta heterocigosidad del set CHLC Human Screening/Weber Versión 6 (Research Genetics, Huntsville, AL, USA) siendo los marcadores microsatélites seleccionados los siguientes: D1S518, D2S1326, D3S2459, D4S2368, D5S2494, D6S1956, D7S1808, D8S1477, D9S301 y D10S1432. Todos ellos fueron amplificados a partir del ADN genómico siguiendo el siguiente protocolo de PCR: una etapa inicial de desnaturalización a 94°C/4 min, seguido de un programa de 35 ciclos con una etapa de desnaturalización inicial de 94°C/30 s, una etapa de hibridación y elongación a 55°C, y una etapa de extensión final a 72°C/7 min.

Los productos de PCR fueron analizados en geles de poliacilamida no desnaturalizantes al 12% a T^a ambiente, entre 8-12 horas en función del tamaño del alelo estimado para cada marcador microsatélite y a 800 voltios. Todos los fragmentos alélicos fueron visualizados mediante la tinción con plata.

3.5.- ANÁLISIS DE LIGAMIENTO EN FAMILIAS DE ETNIA GITANA.

La localización genética de los loci en los cromosomas se realizó mediante análisis de ligamiento. Para ello se procede a la estima del valor *LOD* o *LOD score* (*Z*) que se define como el logaritmo de la probabilidad relativa de que dos loci estén ligados para una determinada fracción de recombinación (*q*), calculada como el cociente entre la probabilidad de que los loci se encuentren ligados (siendo su fracción de recombinación θ) sobre la probabilidad de que no estén ligados (con una fracción de recombinación de 0,5). Todas las puntuaciones *LOD* son a $\theta = 0,5$, debido a que en esas condiciones miden el cociente entre dos probabilidades idénticas y el $\log_{10}(1) = 0$. Para fracciones de recombinación más pequeñas los límites críticos para un test único son $Z = 3,0$ y $Z = -2,0$. Un $Z = 3,0$, o lo que es lo mismo una probabilidad relativa favorable al ligamiento de 1000 a 1, es el límite para aceptar su existencia con una probabilidad de error del 5%. El ligamiento puede rechazarse como hipótesis si $Z < -2,0$. Los valores de *Z* comprendidos entre -2 y +3 no son concluyentes. Para su cálculo se suelen emplear paquetes informáticos como el FASTLINK 2.1 (Lathrop and Lalouel, 1984).

El método estadístico empleado en el cartografiado genético en este estudio fue el análisis de ligamiento bipuntual, *LOD score* o *Z*, que refiere al análisis de cada marcador con respecto al locus de la enfermedad. Este análisis se realizó asumiendo herencia autosómica recesiva, penetrancia completa e iguales frecuencias alélicas para cada marcador. Los valores de *LOD score* se calcularon utilizando el programa MLINK versión 5.1 del paquete FASTLINK 2.1 (Lathrop and Lalouel, 1984). Este análisis de ligamiento fue realizado en las familias que cumplieran al menos uno de estos dos requisitos: varios hijos enfermos o consanguinidad parental, teniendo padres sanos.

3.5.1.- Estudio del locus NSMH-Russe en el cromosoma 10q23

Para este estudio se seleccionaron 5 marcadores microsatélites localizados en el cromosoma 10q23 en base a: cen_D10S1646-D10S210-D10S1647-

D10S1672-D10S560_tel, que abarcan una región de 2,9 Mb. El refinamiento del intervalo crítico mostrado por algunas de las familias, fCMT-42, fCMT-444, fCMT-502, se realizó utilizando otros 2 marcadores microsatélites D10S2480 y D10S1678, y 7 SNPs, rs874556, rs5030948, rs953724, rs906219, rs5030972, rs4746828, rs2394529, localizados dentro de la región analizada de 2,9 Mb. La información a cerca de los distintos marcadores microsatélites y SNPs utilizados en este estudio se resume en las tablas 11, 12 y 13.

Los marcadores microsatélites se seleccionaron a partir de publicaciones anteriores (Rogers et al., 2000; Thomas et al., 2001) mientras que los SNPs se seleccionaron de la base de datos UCSC Genome Bioinformatics, <http://genome.cse.ucsc.edu>. Las PCRs se realizaron a partir de ADN genómico total utilizando los distintos marcadores microsatélites. Las condiciones de las PCRs fueron las siguientes: una etapa inicial de desnaturalización a 94°C/4 min, seguido de un programa de 35 ciclos con una etapa de desnaturalización inicial de 94°C/30 s, una etapa de hibridación y elongación de 55°C (D10S1646, D10S210 y D10S560) ó de 59°C (D10S1647, D10S1672 y D10S1678), y una etapa de extensión final a 72°C/7 min. El marcador microsatélite D10S2480 se amplificó del siguiente modo: una etapa inicial de desnaturalización a 94°C/4 min, seguido de un programa de 35 ciclos con una etapa de desnaturalización inicial de 94°C/30 s, una etapa de hibridación y elongación entre 63°C/30 s y una extensión de 72°C/30 s, y una etapa de extensión final a 72°C/7 min. Los productos de PCR fueron analizados en geles de poliacilamida no- desnaturalizantes al 12% a T^a ambiente, entre 8-12 horas en función del tamaño del alelo estimado para cada marcador microsatélite y a 800 voltios. Todos los fragmentos alélicos fueron visualizados mediante la tinción con plata.

El análisis de los 7 SNPs, rs874556, rs5030948, rs953724, rs906219, rs5030972, rs4746828, rs2394529 se determinó tras la amplificación por PCR a partir de ADN genómico de las muestras de interés utilizando cebadores específicos derivados de los extremos 5'→3'. La detección se realizó mediante la

Material y métodos

técnica de los SSCPs en geles de poliacrilamida:bisacrilamida (29:1) al 12% y posterior visualización mediante la tinción con plata.

Tabla 11.- Información de los marcadores microsatélites ligados al locus NSMH-Russe (10q23).

Nombre	Max Heter	Cebadores 5'→3'	Tamaño pb
D10S1646	0.7500	TCAGACTGGAAGGACATCA CTGTATTAGTCAGGGTTCTTCAGAG	215-229
D10S210	0.7951	CCTCAATGCACAACCTCCT CTCAGACCTGGGTCAAGATA	130-140
D10S1647	0.8155	TCCTACCCGGCACAAGT ATCAAGCCTGAACAAAGCAT	200-218
D10S1672	0.7625	TTGCCCTTGCCCAGATTA GTGAAACTCCGCCTCAAAA	123-143
D10S560	0.6406	ATAACCCCAAACACCTGACC TGAGGGGCATAAGGGATTG	184-208
D10S2480	*ND	CTGAGTTAGGGTCTTGCTATG TAAGGAAGACAACTCATTATTTCC	185-201
D10S1678	0.6238	AAGCCCCAGGCAACAC GGTATCAGTGATGGTTTCCA	165-177

*ND: no disponible

Tabla 12.- Información de los SNPs ligados al locus 10q23.

SNP	Heter.	Frecuencia alélica	Loc. física	Cebadores 5'→3'
rs 874556	0.486	A=0.585	70662670	AGCTGCAGAGAAGAGAAAGC
		G=0.415	pb	AAGCGACACGTGCAGATGGA
rs 5030948	0.232	C=0.866	70680381	AGCTCTTTGATCACATTGTG
		T=0.134	pb	AAGAGGAAGGAAGCCCAC
rs 953724	0.332	C=0.790	70651223	TGCCAAGGGTCAACAGGAG
		T=0.210	pb	ACCTTGGCTAAGTCCTCCTG

Tabla 13.- Información de los SNPs ligados al locus 10q23.

SNP	Heter.	Frecuencia alélica	Loc. física	Cebadores 5'→3'
rs 906219	0.349	G=0.775	70696515	ATTGGTCTCTGACCAACTGATC
		T=0.225	pb	CATGCTGTCAGAAGATGGCAGT
rs 5030972	0.486	A=0.585	70662976	AAGCAGCAGTGCAGGAATTGG
		G=0.415	pb	TCACGCTGCCACCTCATCATG
rs 4746828	0.483	C=0.593	70662256	AGTGATGGCATCCCAGGATG
		T=0.407	pb	GAACTAAGTCAGCCTGACTCT
rs 2394529	0.494	G=0.556	70655273	AAGCCTGACCTGGTTCCATC
		C=0.444	pb	CAAGACACTGAAATGGTACCA

3.5.2.- Estudio del locus CMT4C en el cromosoma 5q23-33

Para este estudio se seleccionaron 6 marcadores microsatélites y 1 SNP intragénico del gen *SH3TC2*, cuya localización física en el cromosoma 5q23-33 es: cen_D5S658-D5S1480-D5S413-IVS14+69C/T-D5S2015-D5S636-D5S820_tel que abarcan una región 17.6 Mb. La información de los marcadores microsatélites utilizados se obtuvo de la base de datos (UCSC Genome Bioinformatics, <http://genome.cse.ucsc.edu>) de acuerdo con los estudios previos realizados (Senderek *et al.*, 2003c) (Tabla 14). El SNP IVS14+69C/T es un polimorfismo intragénico localizado en el intrón 14 del gen *SH3TC2*.

Las PCRs se realizaron a partir de ADN genómico total utilizando los distintos marcadores microsatélites. Las condiciones de las PCRs fueron las siguientes: una etapa inicial de desnaturalización a 94°C/4 min, seguido de un programa de 35 ciclos con una etapa de desnaturalización inicial de 94°C/30 s, una etapa de hibridación y elongación de 55°C (D5S658, D5S636 y D5S820) ó de 58°C (D5S1480, D5S413 y D5S2015), y una etapa de extensión final a 72°C/7 min. Los productos de PCR fueron analizados en geles de poliacilamida no-

Material y métodos

desnaturalizantes al 12% a T^a ambiente, entre 8-12 horas en función del tamaño del alelo estimado para cada marcador microsatélite y a 800 voltios. Todos los fragmentos alélicos fueron visualizados mediante la tinción con plata.

El análisis del SNP intragénico IVS14+69C/T se determinó tras la amplificación por PCR a partir de ADN genómico de las muestras de interés utilizando cebadores específicos derivados de los extremos 5'→3' correspondientes al exón 14 del gen *SH3TC2*, publicados anteriormente (Senderek et al., 2003c). La detección se realizó mediante la técnica de los SSCPs en geles de poliacrilamida:bisacrilamida (29:1) al 12% y posterior visualización mediante la tinción con plata.

Tabla 14.- Información de los marcadores microsatélites ligados al locus CMT4C (5q23-33).

Nombre	Max Heter	Cebadores 5'→3'	Tamaño pb
D5S658	0.8400	TTTGAAGGGCACTACGAAGATCCTC ATTCTCTATTGGAGCCAAGCCAAG	264-282
D5S1480	*ND	TTGGGAAGAATAGCTTTCCCC TTCTAGCTTCCCCCTATGCT	218-239
D5S413	0.6985	AGTCACCTTCTCTGTCTCCA AGGCCTCATTCAAAATCTGT	264-276
D5S2015	0.7000	TTGGCTAATGGGAGGCAACA GCTACCTAAAGAACACAGTCATGGC	171-185
D5S636	0.7800	AAGGCATATGGGAAATATCTGT CCACACCATTATGACATTTTCT	130-152
D5S820	*ND	ATTGCATGGCAACTCTTCTC GTTCTTCAGGGAAACAGAACC	190-218

*ND: no disponible

3.5.3.- Análisis de mutaciones en los genes *SH3TC2* y *NRGDI*

Los 17 exones del gen *SH3TC2* se amplificaron a partir de ADN genómico utilizando cebadores específicos derivados de los extremos 5'→3' y de las secuencias intrón-exón descritos anteriormente (Senderek et al., 2003c) (Tabla 15).

Las condiciones de las PCRs fueron las siguientes: una etapa inicial de desnaturalización a 94°C/4 min, seguido de un programa de 35 ciclos con una etapa de desnaturalización inicial de 94°C/30 s, una etapa de hibridación y elongación de 62-64°C, una etapa de extensión a 72°C, y una etapa de extensión final a 72°C/7 min. Los productos de PCR fueron analizados mediante la secuenciación directa de los productos de PCR purificados (Qiagen, Hilden, Germany) en un secuenciador ABI PRISM 3100 utilizando dideoxinucleótidos marcados fluorescentemente y uno de los cebadores de la reacción de PCR. Todas las secuencias se determinaron para ambas cadenas y fueron analizadas con el programa de análisis Chromas, versión Chromas 161.

En el caso del análisis de la mutación p.R148X (c.564C>T) del gen *NDGRI*, se amplificó el exón 7 a partir de ADN genómico con cebadores específicos descritos anteriormente (Kalaydjieva *et al.*, 2000) y posterior digestión del producto de PCR con la enzima de restricción *TaqI*. Se tomaron 10µl del producto de PCR, 5µl del tampón recomendado por la casa comercial, 5U de enzima y la cantidad necesaria de H₂O para completar hasta un volumen final de 50µl. Los tubos de digestión se dejaron a 65°C en el baño seco durante 3-4 horas. Los productos se analizaron en un gel de poliacrilamida al 12% durante 4 horas. La detección del gel se realizó mediante tinción con plata.

Tabla 15.- Cebadores utilizados para amplificar los 17 exones del gen *SH3TC2*

Nombre	Exones incluidos	Cebador 5'→3'	T ^a de Hibridación
1	Exón 1	GCTGTAGCCGGGATATCAAA AGCACAATCATCTCCCCATC	63°
2	Exón 2	CCATGCCACTAATCCTGGAA TCATCAAGAGGGAAAGAGGG	63°
3	Exón 3	CACCAGTTGAGGGTTCAGGT GGACCTACTTTGTTCCAGATGC	63°
4	Exón 4	TGACGTAAAAATCAATGCCA TAATTACCAGAGCCAGGCCA	63°
5	Exón 5	GGTCTGGGAATCAAGCTCAG ACAGGTGGGTTCATTTGIGA	63°
6	Exón 6	CCAGGAAGAAAAGTACTCCAGC TCACACTATGGATGCCCA	64°
7	Exón 7	TTCTCAATAAACTTTTGCCATCA TGGCTTCCCTAAATCCAGTT	63°
8	Exón 8	AGTCTGGGAACCCCTCATT GTGCTTTTCTGGCTCCATGT	63°
9	Exón 9	ATTTGCGGGAAGTTGGTTT CATGGCCACCCAAATTCAT	63°
10	Exón 10, 11	TGAATGCCAAGGCTCCTAAG TCCAGGTAGGCCACAAACTC	63°
11A	Exón 11	ACTGGTCAGGAGGAGGAGG GGAGGGTGTCCAGAGAGGA	64°
11B	Exón 11	AAGCATGAACTCGACGTGGT TAAGAGATAGGCCCATGCCA	64°
11C	Exón 11	GCCCTGTGTCTCATCCTTTC GATGCCTTAAGCCAAACAGC	64°
11D	Exón 11, 12	CCTGCAGGCTGTACGACTCT CTTCCTTTGGCTGATGAGGA	62°

Tabla 15 (Continuación).- Cebadores utilizados para amplificar los 17 exones del gen *SH3TC2*

Nombre	Exones incluidos	Cebador 5'→3'	T^a de Hibridación
13	Exón 13	GCTG TTCCTGCTCAGAGCTT TCCACAGGCTTAGGGTGAAC	63°
14	Exón 14	GGGGGACTTTAGCAGAGGAT AGGAGAAGAGGGACTCAGGC *TGCCAGGACCTGTCTCAGC	63°
15	Exón 15	TTTTAGTCCACTGCCGTTCC CACACAGTCTGACTCCAGGG	63°
16	Exón 16	CAGCACAGTCCCTGACATCT CTGGTTTTCTCAGCTCCACC	63°
17	Exón 17	ATGTTGGGCAAACAAACAAA AGGTAAGGACTCGGACCCTC	63°

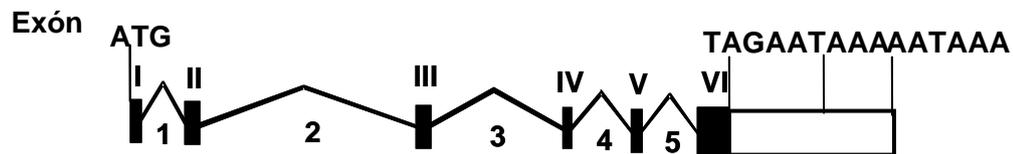
**Cebador reverso que da lugar a un amplicón de menor tamaño para el exón14 del gen SH3TC2, dejando fuera del amplicón el SNP IVS14+69C/T.*

4.- Resultados

4.1.- ANÁLISIS GENÉTICO DEL GEN *GDAP1*

El gen *GDAP1* se extiende a lo largo de una secuencia genómica de 13.8 Kb de ADN en el cromosoma 8q21.1 y consta de 6 exones, cuyos tamaños oscilan entre 95 y 382 nucleótidos. La secuencia de *GDAP1* contiene una ORF de 1077 nucleótidos y codifica para una proteína de 358 aminoácidos. El exón 6 tiene una parte no codificante y al menos dos señales de poliadenilación que se utilizan en la transcripción fisiológica del gen dando lugar a dos transcritos, uno de 3.9 Kb y otro de 2.9 Kb (Cuesta *et al.*, 2002) (Fig.16).

A



Intrón

B

Exón	pb	Intrón	pb	Sitio aceptor de <i>splicing</i>	Sitio donador de <i>splicing</i>
I	117	1	695		<i>caaaaggtacaaca</i>
II	193	2	8620	<i>tctccaggigcgc</i>	<i>tgatggtaatgtt</i>
III	174	3	1523	<i>tctccaggigcgc</i>	<i>ttcgtagtatgtaa</i>
IV	95	4	910	<i>attatcaggccaaa</i>	<i>ctaaagtaagcca</i>
V	115	5	115	<i>taattagtcaaag</i>	<i>cccaggtaggttc</i>
VI	382			<i>ctaattagaagagg</i>	

Figura 16.- A: Organización genómica del *GDAP1* humano. Estructura del gen en intrones y exones. La secuencia codificante del exón 6 se indica en negro y la secuencia no codificante se indica en blanco. Los exones codificantes se representan en cajas negras y los intrones con una línea negra quebrada que conecta los exones. B: Tamaño en pb de los intrones y exones del gen *GDAP1*. Secuencias de los sitios donantes y aceptores de *splicing* correspondientes a los exones del gen *GDAP1*.

4.1.1.- Análisis de mutaciones en el gen *GDAP1*

Se estudió un total de 129 pacientes pertenecientes a 118 familias no emparentadas entre sí con la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, con el fin de determinar la frecuencia y tipo de mutaciones en el gen *GDAP1* en la población española. De estas 118 familias, 91 eran casos esporádicos, 17 familias presentaban un patrón de herencia autosómico recesivo, mientras que 10 familias no presentaban un patrón de herencia claro y no se podía descartar o era compatible con un patrón de herencia dominante. Todos los pacientes estudiados eran de origen español.

Detectamos la presencia de mutaciones en el gen *GDAP1* en 11 pacientes de nuestra serie de estudio (4 mujeres y 7 varones), 9 de los cuales eran casos esporádicos (LF127, LF135, VAL.3, VAL.4, VAL.5, VAL.8, VAL.25, VAL.28, VAL.29) y 2 familias no emparentadas entre sí (LF292 y LF293). En ocho casos encontramos dos mutaciones (LF127, LF135, VAL.3, VAL.4, VAL.5, VAL.25, VAL.28, VAL.29), mostrando una herencia autosómica recesiva. Por el contrario, en dos familias (LF292 y LF293) y un caso esporádico (VAL.8) compatibles con un patrón de herencia autosómico dominante se encontró una única mutación, sugiriendo una expresión dominante. De las mutaciones encontradas, 3 ya habían sido descritas previamente (Cuesta *et al.*, 2002), p.Q163X, p.S194X y p.T288fsX3, mientras que se caracterizaron otras 3 nuevas mutaciones durante la realización de este estudio, p.E114fs, p.R120W, p.T157P (Claramunt *et al.*, 2005) (Tabla 16).

Tabla 16.- Mutaciones en el gen *GDAP1* en pacientes CMT4A.

Exón	Cambio nucleotídico	Efecto en la secuencia codificante	Número de cromosomas mutantes	Aminoácido correspondiente a genes ortólogos <i>GDAP1</i> y parálogo <i>GDAP1L1</i>
3	c.342_345delAAAG	p.E114fs, proteína truncada	1	-
3	c.358C>T	p.R120W	2	R, R, R, R, R, R, R
3	c.469A>C	p.T157P	1	T, T, T, T, T, T, T
4	c.487C>T	p.Q163X, proteína truncada	13	-
5	c.581C>G	p.S194X, proteína truncada	1	-
6	c.863_864insA	p.T288fsX3, proteína truncada	1	-

La mutación p.Q163X (c.487C>T) es una transición C>T en el nucleótido 487 que resulta en el cambio de una glutamina por un codón de parada en la posición 163, en el exón 4 del gen *GDAP1*. Esta mutación la encontramos en 7 casos esporádicos pertenecientes a 7 familias no emparentadas entre sí, y en todas ellas se asoció con un modo de herencia autosómica recesiva. La mutación estaba en homocigosis en 6 de los pacientes probando (familias LF135, VAL.3, VAL.4, VAL.25, VAL.28, VAL.29) mientras que un paciente probando (familia VAL.5) la presentaba en heterocigosis. El análisis de la mutación en los padres, en aquellos casos en los que se disponía de muestra, mostraba que eran portadores heterocigotos sanos para dicha mutación. La detección de la mutación p.Q163X la realizamos mediante análisis de restricción (fig.17) y posteriormente, mediante la secuenciación directa del producto de PCR purificado (fig.18). Del resto de pacientes estudiados, en total 122, ninguno presentaba esta mutación.

Resultados

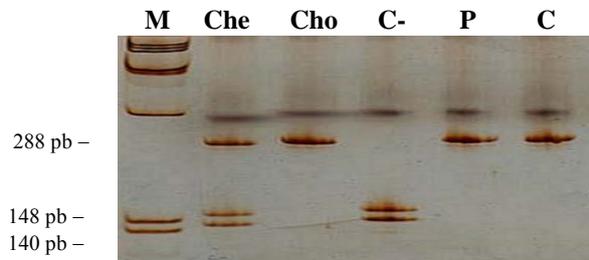


Figura 17.- Detección de la mutación *p.Q163X* mediante análisis de restricción con la enzima *BsuRI* (*Hae III*) en la familia *LF135*. La mutación *p.Q163X* en el exón 4 del gen *GDAP1* elimina un sitio de restricción *BsuRI* con lo que las muestras que tienen la mutación no se produce la digestión del fragmento de 288 pb amplificado por PCR en dos fragmentos de 148 pb y 140 pb. M: marcador pesos moleculares *pGEM*; Che: control heterocigoto; Cho: control homocigoto; C-: control individuo sano; P: probando homocigoto enfermo; C: muestra sin digerir.

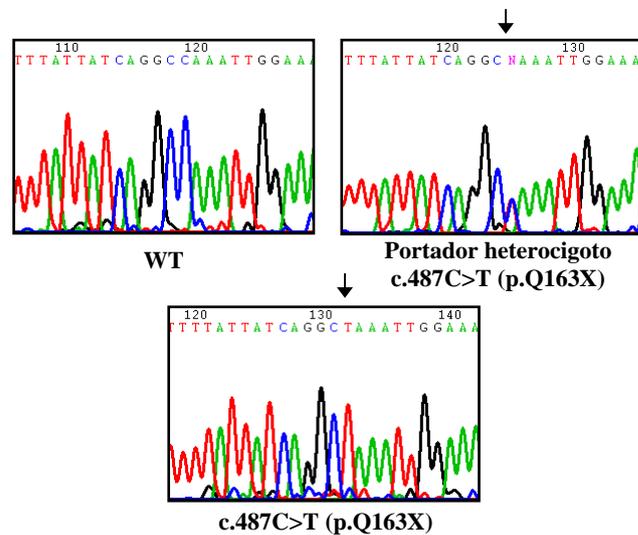


Figura 18.- Electroforegramas de la mutación *p.Q163X*. La figura muestra el resultado de la secuenciación directa correspondiente a un individuo sano (*WT* = wild type o salvaje), a un individuo heterocigoto compuesto para dicha mutación (familia *VAL.5*) y a un individuo homocigoto enfermo (familias *LF135*, *VAL.3*, *VAL.4*, *VAL.25*, *VAL.28*, *VAL.29*).

En el paciente afectado heterocigoto para la mutación p.Q163X, perteneciente a la familia VAL.5, tras el análisis de mutaciones en los 5 exones restantes que conforman el gen *GDAP1*, observamos la deleción de 4 nucleótidos (c. 342_345delAAAG) en el exón 3 del gen *GDAP1*. Esta deleción es una mutación *frameshift* o cambio de la pauta de lectura que genera un codón de parada en la posición 145, p.E114fs, dando lugar, supuestamente, a una proteína truncada. La detección de dicha mutación en el paciente afectado la realizamos mediante la técnica de los SSCPs y secuenciación directa del producto de PCR purificado correspondiente al exón 3 (fig.19). El análisis de la mutación en los padres mediante la secuenciación directa a partir del producto de PCR purificado, indica que la madre es la portadora de dicha mutación. Del resto de pacientes estudiados, en total 122, ninguno presentaba esta mutación.

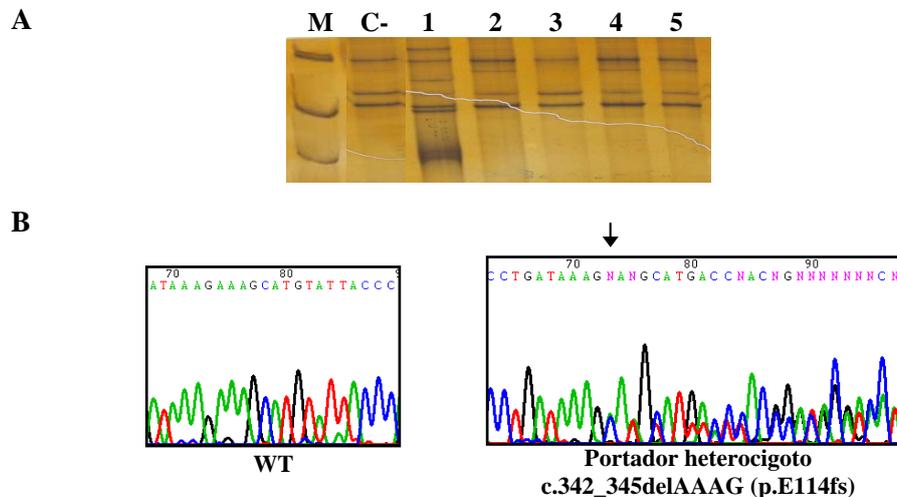


Figura 19.- Análisis de la mutación p.E114fs (c.342_345delAAAG) en la familia VAL.5. A: Detección de la mutación p.E114fs mediante la técnica de SSCPs en el probando de la familia VAL.5. M: marcador de pesos moleculares 1Kb; C-: control individuo sano; Línea 1: individuo afecto heterocigoto compuesto; Líneas 2, 3, 4, 5: casos índice pertenecientes a otras familias sin la mutación. B: Electroforegrama de la mutación p.E114fs en el exón 3 del gen *GDAP1*.

Resultados

La mutación p.S194X (c.581C>G) es una transición C>G en el nucleótido 581 que resulta en el cambio de una serina por un codón de parada en la posición 194, en el exón 5 del gen *GDAPI*. Esta mutación fue encontrada en heterocigosis en un caso esporádico (familia LF127) con herencia autosómica recesiva cuya detección se realizó empleando la técnica de los SSCPs y posterior secuenciación directa del producto de PCR purificado (fig.20 y fig.21). El análisis de la mutación en los padres mostraba que la madre era portadora heterocigota sana para dicha mutación. Del resto de pacientes estudiados, en total 121, ninguno presentaba esta mutación.

En este mismo paciente detectamos mediante la secuenciación directa del producto de PCR purificado la presencia de la mutación p.T288fsX3 (c.863_864insA) en el exón 6 del gen *GDAPI*, una inserción de una adenina en la posición nucleotídica 863_864, produciendo un cambio en la pauta de lectura que genera un codón de parada en la posición 290 dando lugar, supuestamente, a una proteína truncada (fig.21). El análisis de la mutación en ambos padres mostraba que el padre era el portador heterocigoto sano de dicha mutación. Del resto de pacientes estudiados, en total 121, ninguno presentaba esta mutación.

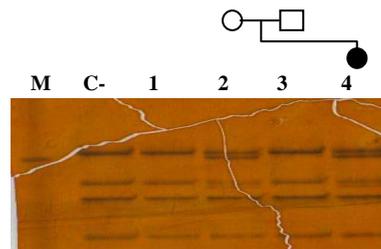


Figura 20.- Análisis de mutaciones en la familia LF127. Detección de la mutación p.S194X mediante la técnica de SSCPs en la familia LF127. M: marcador de pesos moleculares 1Kb; C-: control individuo sano; Líneas 1, 3: pacientes sanos; Línea 2: individuo heterocigoto sano; Línea 4: paciente heterocigoto compuesto con la mutación p.T288fsX3 (c.863_864insA).

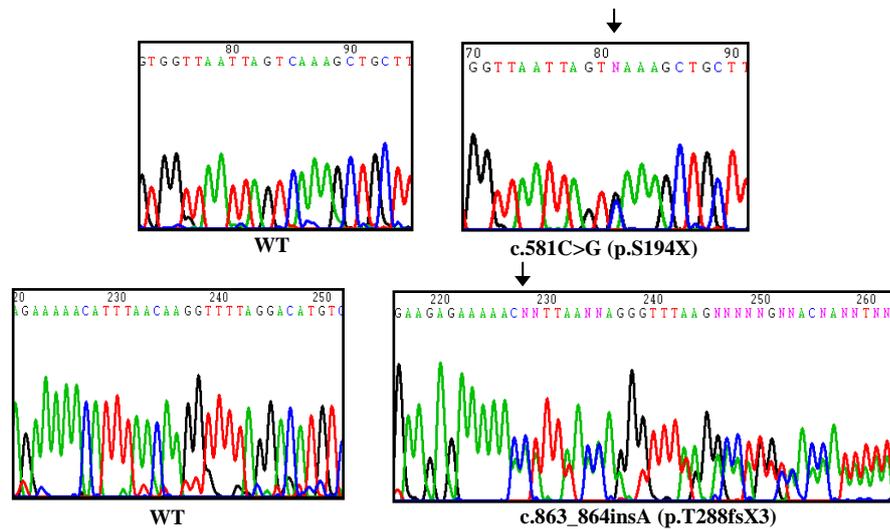


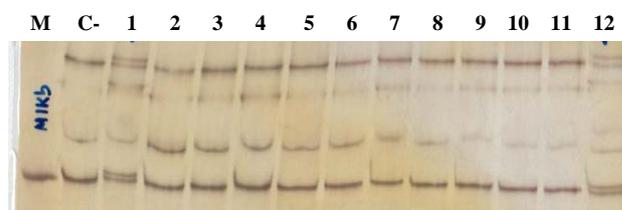
Figura 21.- Análisis de mutaciones en la familia LF127. Electroforegramas de las mutaciones *p.S194X* y *p.T288fsX3* en los exones 5 y 6, respectivamente, del gen *GDAP1* en el paciente enfermo de la familia LF127.

Se caracterizaron otras 2 nuevas mutaciones durante la realización de este estudio, *p.R120W* y *p.T157P*, que son mutaciones *missense* o sustitución de una base por otra en el ADN dando lugar a una sustitución de un aminoácido por otro. La mutación *p.R120W* fue encontrada en heterocigosis en 2 familias, LF292 y LF293, en ambas el fenotipo CMT parece segregar con un patrón de herencia autosómico dominante. En el caso VAL.8 la mutación *p.T157P* fue detectada en heterocigosis. Se trata de una mutación *de novo* en un caso esporádico, lo que sugiere un patrón de expresión dominante.

Resultados

La mutación p.R120W (c.358C>T) es una sustitución C>T en el nucleótido 358 en el exón 3 del gen *GDAP1*, que resulta en un cambio de una arginina por triptófano en la posición 120; se genera un cambio de un aminoácido con carga positiva (arginina) por un aminoácido neutro polar (triptófano). Este cambio lo encontramos en dos pacientes probando pertenecientes a dos familias no emparentadas entre sí, LF292 y LF293, en heterocigosis. La detección de dicha mutación la realizamos mediante la técnica de los SSCPs y posterior secuenciación directa del producto de PCR purificado correspondiente al exón 3 (fig.22). Tras la secuenciación directa del producto de PCR purificado correspondiente a los exones 1, 2, 4, 5 y 6 no encontramos ningún otro cambio en los dos probandos correspondientes a las familias LF292 y LF293.

A



B

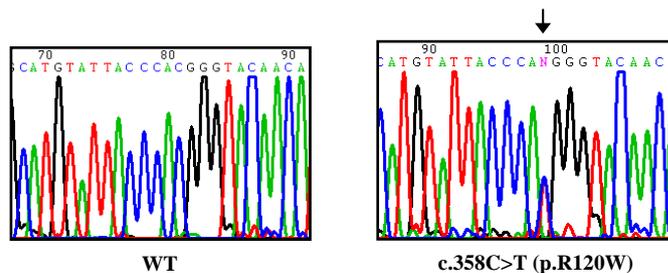


Figura 22.- Análisis de la mutación p.R120W (c.358C>T) en los casos probando correspondientes a las familias LF292 y LF293. A: Detección de la mutación p.R120W mediante la técnica de SSCPs en los dos probandos de las familias LF292 y LF293. M: marcador de pesos moleculares 1Kb; C-: control individuo sano; Líneas 1 y 12: individuo afecto heterocigoto de la familia LF292 y LF293, respectivamente; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11: casos índice pertenecientes a otras familias sin la mutación. B: Electroforegrama de la mutación p.R120W en el exón 3 del gen *GDAP1*.

La mutación p.T157P (c.469A>C) es una transversión A>C en el nucleótido 469 en el exón 3 del gen *GDAP1*, que resulta en un cambio de una treonina por prolina en la posición 157; se genera un cambio de un aminoácido neutro polar (treonina) cuya cadena lateral es hidrófila por un aminoácido neutro no polar (prolina) cuya cadena lateral es hidrófoba. La detección de dicha mutación la realizamos mediante la técnica de los SSCPs y posterior secuenciación directa del producto de PCR amplificado correspondiente al exón 3 (fig.23). Tras la secuenciación directa del producto de PCR purificado correspondiente a los exones 1, 2, 4, 5 y 6 no encontramos ningún otro cambio patogénico.

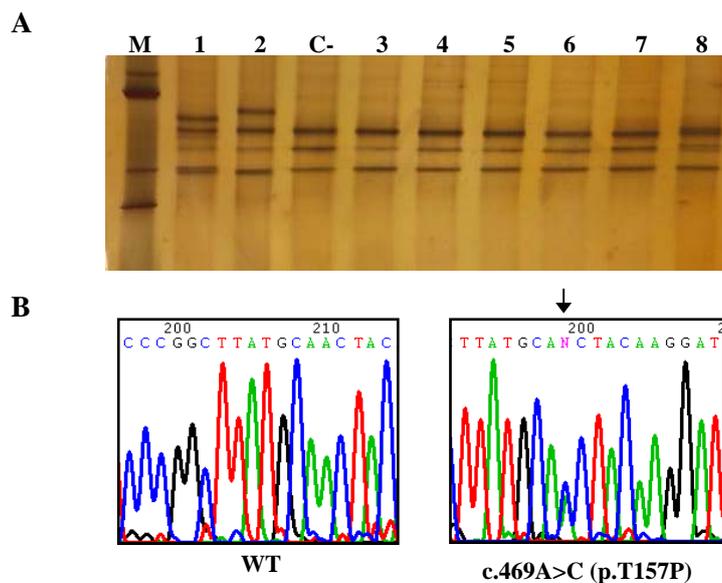


Figura 23.- Análisis de la mutación p.T157P (c.469A>C) en la familia VAL.8. A: Detección de la mutación p.T157P mediante la técnica de SSCPs. M: marcador de pesos moleculares pGEM; Líneas 1,2: individuos heterocigotos para la mutación p.R120W y p.E114fs, respectivamente; C-: control individuo sano; Líneas 3, 4, 5, 6 y 7: individuos sanos; Línea 8: individuo afecto heterocigoto de la familia VAL.8. B: Electroforegrama de la mutación p.T157P en el exón 3 del gen *GDAP1*.

Resultados

Al comparar la secuencias de aminoácidos mutados para ambas mutaciones, p.R120W y p.T157P, con las secuencias estándar en otros genes ortólogos de *GDAP1* y con el gen parálogo *GDAP1L1*, localizado en el cromosoma 20, y sus respectivos genes ortólogos, para determinar si los cambios mutacionales afectaban a aminoácidos conservados, observamos que sí involucraba aminoácidos de la secuencia altamente conservados (fig.25). Con el fin de descartar que pudieran ser polimorfismos neutros de la población general española analizamos el cambio p.R120W y p.T157P en 196 cromosomas normales, no encontrándolos en ninguno de ellos.

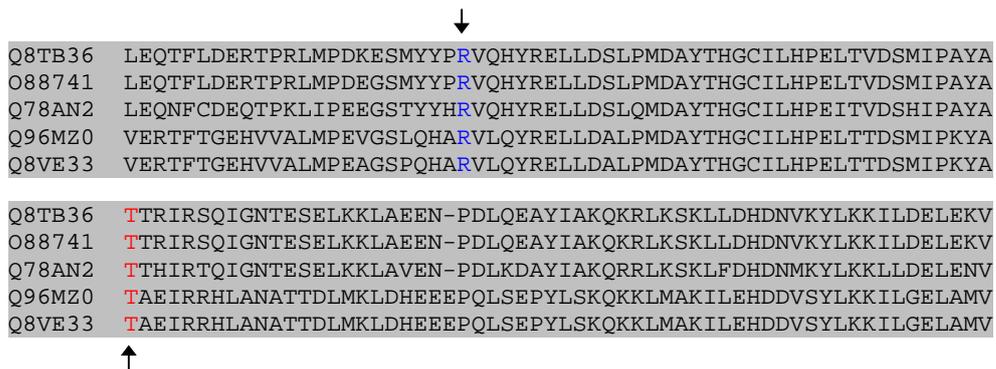


Figura 24.- Alineamiento, ordenados de arriba abajo, de los productos proteicos del gen *GDAP1*, sus ortólogos en ratón y pez cebra, y el gen parálogo *GDAP1L1*, y su ortólogo en ratón, obtenidos con el programa *CLUSTALW* (<http://coot.embl.de/Alignment//alignment.html>). La primera columna indica los números de identificación de las proteínas obtenidas de la base de datos: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las letras *R* y *T*, indican la posición de los aminoácidos, arginina y treonina respectivamente, que permanecen conservados en todas las secuencias proteínicas.

4.1.2.- Modo de herencia mendeliana.

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 4A, tanto en su forma desmielinizante como axonal, ha sido descrita originariamente en familias que segregan la enfermedad con un patrón de herencia autosómico recesivo. En nuestra serie de estudio de las 11 familias con mutación, 8 de ellas (LF127, LF135, VAL.3, VAL.4, VAL.5, VAL.25, VAL.28, VAL.29) la enfermedad segrega con herencia autosómica recesiva. Sin embargo, encontramos que 3 pacientes pertenecientes a 3 familias no emparentadas entre sí, podrían segregar la enfermedad de modo autosómico dominante.

En la familia LF292 pudimos confirmar dicho patrón de segregación autosómico dominante al extender el estudio del análisis de la mutación p. R120W en el exón 3 del gen *GDAP1* al resto de la familia, cuyo árbol genealógico estaba compuesto de 3 generaciones (ver pág. 67 de material y métodos), lo que nos permitió detectar dicha mutación en heterocigosis en todos los miembros de la familia afectados, mientras que no la encontramos en los individuos sanos (individuo I.2 y el individuo III.3), en los que no se detectaron patrones electroforéticos anómalos (fig.25). Los individuos II.1 y II.4 no fueron incluidos en el análisis de mutaciones al carecer de muestra. Posteriormente, realizamos la secuenciación directa a partir del producto de PCR amplificado del resto de exones que conforman el gen *GDAP1* en todos los miembros de la familia no encontrando ningún cambio patogénico.

En la familia LF293, detectamos la mutación p.R120W en el otro hermano enfermo mediante secuenciación directa del producto de PCR purificado. En esta familia no pudimos realizar el estudio genético a ambos padres al carecer de muestra biológica, pero los antecedentes referidos sobre el padre sugerían que podría haber estado afectado.

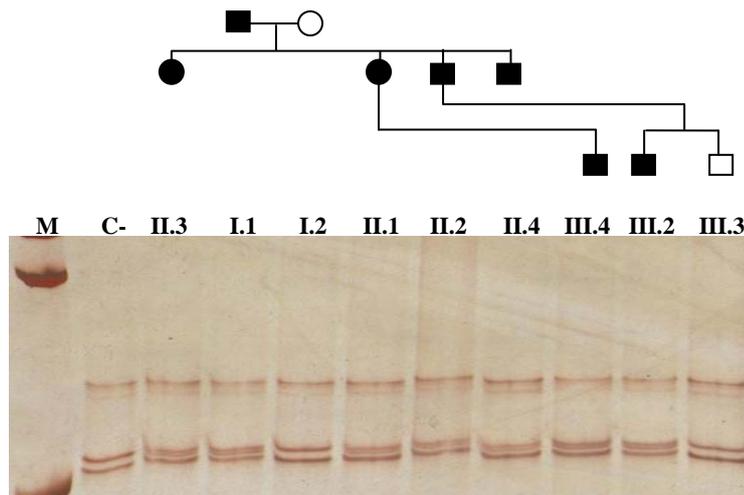


Figura 25.- Análisis de la mutación *p.R120W* (*c.358C>T*) en la familia LF292. Detección de la mutación *p.R120W* mediante la técnica de SSCPs en los miembros de la familia LF292. M: marcador de pesos moleculares pGEM; C-: control individuo sano; II.3: probando afecto heterocigoto; Los pacientes I.1,II.1, II.2, II.4, III.4, III.2: individuos afectados heterocigotos. Pacientes I.2 y III.3: corresponde a los individuos sanos.

En la familia VAL.8 la probando era heterocigota para la mutación *p.T157P*. El análisis de mutaciones mediante la secuenciación directa del producto de PCR purificado correspondiente al exón 3 del gen *GDAP1* en ambos padres reveló que ninguno de ellos era portador de dicha mutación. Mediante el genotipado de 10 marcadores microsatélites no ligados (ver pág. 67 de material y métodos) del set CHLC Human Screening/Weber Versión 6 (Research Genetics, Huntsville, AL, USA) excluimos la falsa paternidad y confirmamos que, tal como ya se había mencionado anteriormente, se trataba de un suceso “*de novo*”, cuya expresión sería dominante.

4.1.3.- Variabilidad fenotípica

Con el objeto de correlacionar las mutaciones encontradas en 11 familias de nuestra serie de estudio y los patrones de herencia con la gravedad de la enfermedad, recopilamos datos electrofisiológicos y características clínicas de los probandos de las 11 familias.

En nuestra serie de estudio diferenciamos 2 grupos: a) los pacientes portadores de 2 mutaciones y con un patrón de herencia autosómico recesivo (LF127, LF135, VAL.3, VAL.4, VAL.5, VAL.25, VAL.28, VAL.29) y b) los pacientes con una única mutación (LF292, LF293 y VAL.8) y con un posible patrón de herencia autosómico dominante. Los pacientes que segregan con un patrón de herencia autosómico recesivo muestran un fenotipo CMT axonal más grave que los pacientes que segregan con un modo autosómico dominante, con una aparición temprana de la enfermedad y la necesidad de silla de ruedas al final de la primera década de vida o principios de la segunda. El cuadro clínico en estos pacientes se caracteriza, por un inicio precoz de la enfermedad, siendo inferior a los 2 años de edad, asociada a debilidad y atrofia muscular predominantemente distal, deformidad en los pies, arreflexia tendinosa, no hay pérdida de sensibilidad y en la mayoría de casos está asociado a disfonía o parálisis de cuerdas vocales, a excepción del probando de la familia VAL.5. El estudio electrofisiológico y clínico en los padres fue normal. En las tablas 17 y 18 se resumen los datos clínicos y electrofisiológicos correspondientes a los probandos de las familias LF127, LF135, VAL.3, VAL.4, VAL.5, VAL.25, VAL.28, VAL.29.

Resultados

Tabla 17.- Características clínicas de los probandos de las familias LF127, LF135, VAL.3, VAL.4, VAL.5, VAL.25, VAL.28, VAL.29.

Signos y síntomas	LF127	LF135	VAL.3	VAL.4
Primer síntoma	Problemas al andar	Problemas al andar	Debilidad muscular y atrofia	Deformidad en los pies
Edad de aparición	2 años	18 meses	18 meses	17 meses
Edad inicio andar (meses)	11	ND	17	14-15
Necesidad silla de ruedas (años)	13	ND	7	ND
Debilidad músculos distal y proximal	Prox. MI 4/5 Dist. MS 0/5	Prox. MI 0-1/5 Dist. MS 2/5	Prox. MI 2/5 Dist. MS 0/5	Prox. MI 3-4/5 Dist. MS 0/5
Arreflexia tendinosa	Si	Si	Si	Si
Pérdida sensitiva	ND	No, Normal	No, Normal	No, Normal
Pies cavos	Si	Si	Si	Si
Parálisis cuerdas vocales	Si	Si	Si	Si

ND: no disponible; MI/MS (escala de fuerza: 5= normal, 0= pérdida completa).

Signos y síntomas	VAL.5	VAL.25	VAL.28	VAL.29
Primer síntoma	Problemas al andar y frecuentes caídas	Problemas al andar y deformidad en los pies	Marcha en estepaje y frecuentes caídas	Debilidad neuromuscular
Edad de aparición	10 meses	2 años	18 meses	2 años
Edad inicio andar (meses)	15	18	18	18
Necesidad silla de ruedas (años)	Anda	12	Anda	17
Debilidad músculos distal y proximal	Distal	Prox. 2-3/4 Dist. 0-1/5	Prox. 4/5 Dist. 3/5	Prox. 2/5 Dist. 0/5
Arreflexia tendinosa	Si	Si	Si	Si
Pérdida sensitiva	No, Normal	No, Normal	No, Normal	No, Normal
Pies cavos	Si	Si	Si	Si
Parálisis cuerdas vocales	No	Si	ND	Si

ND: no disponible; MI/MS (escala de fuerza: 5= normal, 0= pérdida completa).

Los estudios electrofisiológicos se basan en la obtención de las velocidades de conducción nerviosa, motora y sensitiva, así como la medición de los potenciales de acción compuesto motor del músculo (CMAP) y potenciales de acción sensitivos (SNAP).

Las neuropatías que implican lesión a nivel del axón no alteran las velocidades de conducción nerviosa puesto que todavía puede existir una población de axones normales, pero sí existe una disminución en los valores de los CMAPs y SNAPs debido a que hay pocos axones que puedan “conducir” los potenciales de acción en el músculo.

En varios casos, las VCN están reducidas. Sin embargo, el hecho de que los potenciales de acción estén muy disminuidos sugiere que la lesión primaria se localiza en el axón. La reducción de las velocidades se debería a la pérdida notable del número de axones mielinizados y no a un fenómeno de desmielinización.

Tabla 18.- Características electrofisiológicas de los probandos de las familias LF127, LF135, VAL.3, VAL.4, VAL.5, VAL.25, VAL.28, VAL.29

	VCN motora/CMAP (m.s⁻¹/mV)	VCN sensitiva/SNAP (m.s⁻¹/μV)
LF127	Nervio mediano: NR/NR	Nervio sural: NR/NR
LF135	Nervio mediano: 26/0.7	Nervio mediano: 53/3
VAL.5	Nervio mediano: derecho: 31.9/9.4 izquierdo: 24/1.2	ND
VAL.25	Nervio mediano: 19.1-28.4/ND	Nervio sural: Ausente/ND
VAL.28	Nervio mediano: 18.9/0.55	Nervio sural: Reducida/Reducido
VAL.29	ND	ND
VAL.3	EMG: patrones neurogénicos, VCNs normales	
VAL.4	EMG: patrones neurogénicos, nervios no excitables	

CMAP = siglas en inglés de potencial de acción compuesto motor; SNAP = siglas en inglés de potencial de acción sensitivo; ND: no disponible; NR: no registrados. EMG: examinación electromiográfica. VCN = velocidad de conducción nerviosa.

Las familias LF292 y LF293 en las que la enfermedad segrega con un patrón de herencia autosómico dominante y los pacientes son heterocigotos para la mutación p.R120W, muestran un fenotipo menos grave que las formas recesivas. La

Resultados

enfermedad se manifiesta en la segunda década de vida y progresa muy lentamente, tal es así, que el individuo I.1 se empezó a quejar de problemas entre los 65-70 años de edad. Actualmente, no precisan de silla de ruedas y pueden andar de forma autónoma. La debilidad muscular y la arreflexia tendinosa están menos acusadas que en las formas recesivas. Tampoco observamos disfonía o parálisis de cuerdas vocales, característica en 7 de las 8 familias con herencia autosómica recesiva.

El caso esporádico perteneciente a la familia VAL.8 muestra un fenotipo moderado con respecto a la forma recesiva pero más grave que el mostrado por los pacientes de las dos familias en las que sólo encontramos una única mutación, con la aparición de la sintomatología en la primera década de vida, con una debilidad muscular ligeramente reducida en los miembros inferiores, arreflexia tendinosa y atrofia óptica. No obstante, la historia natural de progreso es menos grave que en los pacientes con herencia autosómica recesiva. En las tablas 19 y 20 se resumen los datos clínicos y electrofisiológicos de estas 3 familias con herencia autosómico dominante.

Tabla 19.- Características clínicas de los probandos de las familias LF292, LF293 y VAL.8

Signos y síntomas	LF292	LF293	VAL.8
Primer síntoma	Marcha en estepaje	Debilidad muscular y atrofia	Marcha inestable con tendencia al estepaje
Edad de aparición	18 años	14 meses	12 meses
Edad inicio andar (meses)	ND	ND	15
Necesidad silla de ruedas (años)	Anda	Anda	Anda
Debilidad músculos distal y proximal	Dist. MMII 3-4/5	Dist. MMII 4/5	Prox. MMII 5/5 Dist. MMII 2-3/5
Arreflexia tendinosa	Normal excepto en tobillo	Normal excepto en tobillo	Si
Pérdida sensitiva	Reducida	No, Normal	Reducida
Pies cavos	Si	Si	Si
Parálisis cuerdas vocales	No	No	No

ND: no disponible; MMII: indica miembros inferiores; MMSS: indica miembros superiores

En las familias LF292, LF293 y VAL.8 observamos que presentan valores de conducción nerviosa normales o ligeramente reducidas, así como una disminución en los potenciales de acción CMAP y SNAP, lo cual sugiere que la lesión es a nivel del axón.

Tabla 20.- Características electrofisiológicas de los probandos de las familias LF292, LF293 y VAL.8.

	VCN motora/CMAP (m.s⁻¹/mV)	VCN sensitiva/SNAP (m.s⁻¹/μV)
LF292	VCN normales/Reducido en los nervios: mediano, peroneal y tibial posterior	VCN ligeramente reducidas / Reducido en nervio sural
LF293	Nervio peroneal: 45/ Ligeramente reducido	ND
VAL.8	Nervio mediano: 45/15	ND

CMAP = siglas en inglés de potencial de acción compuesto motor; SNAP = siglas en inglés de potencial de acción sensitivo; ND: no disponible; VCN = velocidad de conducción nerviosa.

4.1.4.- Análisis de haplotipos y efecto fundador

La mutación más recurrente en nuestra serie de estudio es la p.Q163X presente en 13 cromosomas: 12 de ellos corresponden a seis pacientes homoalélicos para la citada mutación y el restante corresponde a un paciente heterocigoto compuesto para otra mutación diferente (p.E114fs). Para la realización de este estudio también incluimos otras tres familias, también de origen español, portadoras de la mutación p.Q163X (LF20, LF38 y LF249), cuyo análisis de mutaciones y descripciones clínicas habían sido previamente descritas (Cuesta *et al.*, 2003; Sevilla *et al.*, 2003). La familia LF38 es homoalélica para la mutación, mientras que las familias LF20 y LF249, son heterocigotas compuestas con otras mutaciones diferentes (p.T288fsX3 y p.S194X, respectivamente). En total disponemos de 17 cromosomas portadores de la mutación p.Q163X.

Resultados

Cinco pacientes, de los cuales 4 son homocigotos, proceden del País Vasco (VAL.3, VAL.4, VAL.5, VAL.25 y VAL.29) y por tanto, 9 cromosomas portadores de la mutación p.Q163X tienen un origen vasco. Los otros 8 cromosomas mutados proceden de Aragón (VAL.28), Castilla y León (LF38), y de la Comunidad Valenciana (LF20, LF135 y LF249) (Fig.26).

Las otras mutaciones que aparecen en más de un cromosoma, al incluir los datos de las familias LF20, LF38 y LF249 son: la mutación p.R120W (c.358C>T), en 2 cromosomas, la mutación p.S194X (c.581C>G) en 2 cromosomas, y la mutación p.T288fsX3 (c.863_864insA) en 2 cromosomas. Con el fin de determinar si cada mutación tiene un origen ancestral común, procedimos a investigar la presencia de un haplotipo común. El hallazgo de un haplotipo compartido en todos los cromosomas de cada mutación sugiere que la mutación es consecuencia de un suceso único.



Figura 26.- Mapa de España que muestra las 17 Comunidades Autónomas. Los cromosomas portadores de la mutación p.Q163X se representan con un círculo en negro: 9 del País Vasco (Euskadi), 2 de Aragón, 2 de Castilla y León, y 4 de la Comunidad Valenciana.

Para la construcción de los haplotipos, buscamos en las secuencias exónicas codificantes e intrónicas flanqueantes al gen *GDAP1*, la identificación de algún polimorfismo SNP (*single nucleotide polymorphism*) que fuera de utilidad como marcador genético. Tras el análisis de 184 cromosomas de población general española, mediante la técnica de los SSCs y digestión con el enzima de restricción *DdeI*, encontramos en la secuencia codificante correspondiente al exón 4 del gen *GDAP1* el SNP, c.507T>G que representa al cambio sinónimo S169S. Este SNP también ha sido analizado en otros estudios (Boerkoel *et al.*, 2003). El cálculo de las frecuencias alélicas del polimorfismo S169S (c.507T>G) se estimaron en 184 cromosomas de población general española, en 108 cromosomas procedentes de 27 núcleos familiares control de población española y en 224 cromosomas de familias diagnosticadas con la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth autosómica recesiva no portadoras de la mutación p.Q163X, cuyos datos quedan resumidos en la tabla 21.

Tabla 21.- Frecuencias alélicas del polimorfismo S169S (c.507T>G).

Marcador	Alelos obtenidos	Frecuencia población española (%)	Frecuencia núcleos familiares control (%)	Frecuencia familias CMTAR (%)
c.507T/G	Alelo T	0.70	0.60	0.57
	Alelo G	0.30	0.40	0.42

CMTAR = Charcot-Marie-Tooth autosómica recesiva.

Como se muestra en la tabla 21, podríamos decir que ninguno de los alelos es raro, si bien en los tres grupos analizados el alelo T siempre predomina, especialmente en la población general, con una frecuencia del 70% respecto al alelo G que representa el 30%.

Resultados

Tras el análisis de este polimorfismo en las familias portadoras de la mutación p.Q163X observamos que, los 17 cromosomas portadores de la mutación presentan el alelo G (fig. 27). Esto indica que el alelo G está en desequilibrio de ligamiento con la mutación p.Q163X y no con la enfermedad de CMT tipo 4A, ya que el resto de cromosomas mutantes, 6 en total, portadores de las mutaciones p.S194X, p.T288fsX3 y p.R120W, observamos la presencia del alelo T.

Boerkoel *et al.* (2003) publicaron tres familias hispanoamericanas homocigotas para la mutación p.Q163X. Dos familias eran originarias de Costa Rica y la tercera de Perú. Postularon que la mutación podría tener origen en la Península Ibérica. Nosotros nos planteamos analizar esta hipótesis y solicitamos ADN de estos individuos a los autores.

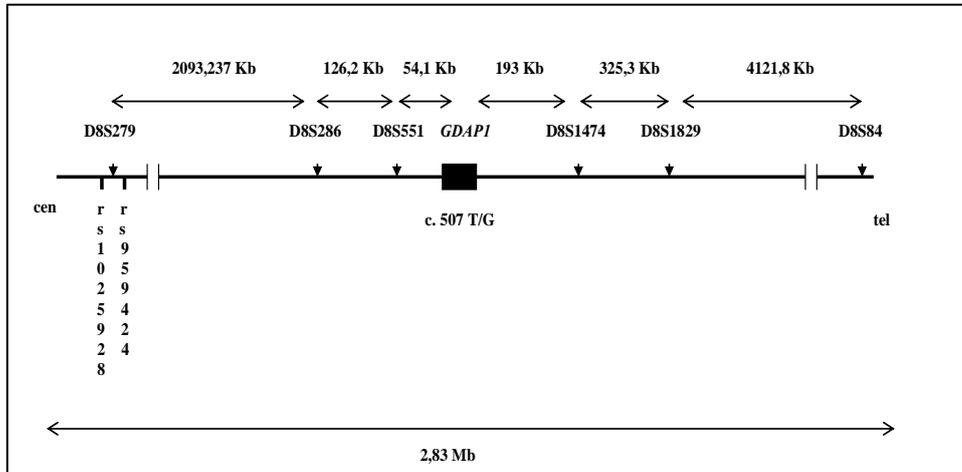


Figura 27.- Mapa físico del locus CMT4A. El gen GDAP1, representado como una caja negra, está situado en el centro de la figura. La posición de los seis marcadores microsatélites ligados, está indicada con una punta de flecha negra. Las flechas \leftrightarrow indican las distancias físicas de un marcador respecto de otro y en el caso de los marcadores D8S551 y D8S1474 respecto al gen GDAP1. El SNP c.507T/G (exónico) aparece ubicado debajo del gen GDAP1. Los SNPs rs1025928 y rs959424 indican su posición con dos líneas verticales próximos al marcador D8S279.

Realizamos la construcción del haplotipo extenso en las familias portadoras de mutación en el gen *GDAP1*, en base a seis marcadores microsatélites polimórficos ligados y flanqueantes al locus CMT4A (D8S279, D8S286, D8S551, D8S1474, D8S1829 y D8S84), que abarcan una región de ~2.83 Mb (fig.27). Las características de los seis marcadores microsatélites flanqueantes al gen *GDAP1* quedan resumidas en la tabla 9 (ver pág. 75 de material y métodos). El resultado de la construcción del haplotipo extenso en las familias portadoras de la mutación p.Q163X en el gen *GDAP1*, se resume en la figura 28.

Si consideramos únicamente el núcleo del haplotipo, D8S551-c.507T/G-D8S1474 en los 17 cromosomas españoles observamos 4 haplotipos diferentes asociados a la mutación p.Q163X: el haplotipo mayoritario 5-G-3 aparece en 13 cromosomas (A, B, D, E, G, H, I, J, K, L, M, P y Q), mientras que los haplotipos 4-G-3, 5-G-2 y 5-G-5 aparecen en los cromosomas C, F, N y O, respectivamente (fig.28). En el estudio de las frecuencias alélicas de 186 cromosomas de población general española, se detectan 5 alelos de los 9 descritos en población caucasiana para el marcador D8S551 (Set alelos GDB: 248608), y 7 alelos para el marcador D8S1474 (tabla 22). El alelo 5 para el marcador D8S551 representa un 24% de los cromosomas de población general española, mientras que el alelo 3 para el marcador D8S1474 representa un 27%. En los 108 cromosomas correspondientes a 27 núcleos familiares control, el haplotipo 5-G-3 representa un 2.77% de las combinaciones obtenidas; el haplotipo 4-G-3 un 0.92%; el haplotipo 5-G-2 un 1.85%; y el haplotipo 5-G-5 un 0.92%.

Resultados

Familia	Cromosomas	Marcadores flanqueantes 5'				SNP	Marcadores flanqueantes 3'		
		rs1025928	D8S279	D8S286	D8S551	c.507T/G	D8S1474	D8S1829	D8S84
LF38	A	C	7	3	5	G	3	6	6
	B	C	7	3	5	G	3	6	6
LF249	C	C	7	2	4	G	3	5	6
LF20	D	C	7	3	5	G	3	6	6
LF135	E	C	5 mut	3	5	G	3	6	6
	F	T	5 rec	3	5	G	2	6	6
VAL.3	G	C	6 mut	3	5	G	3	6	6
	H	T	3 rec	3	5	G	3	6	6
VAL.4	I	C	7	3	5	G	3	6	6
	J	C	7	3	5	G	3	6	6
VAL.5	K	C	7	3	5	G	3	6	6
VAL.25	L	C	7	3	5	G	3	6	6
	M	C	7	3	5	G	3	6	6
VAL.28	N	C	5 mut	3	5	G	5	6	6
	O	C	5 mut	3	5	G	5	6	6
VAL.29	P	C	6 mut	3	5	G	3	6	6
	Q	C	6 mut	3	5	G	3	6	6
HOU1363	R	T	3 rec	3	5	G	3	6	6
	S	C	5 mut	3	5	G	3	6	6
HOU726	T	C	7	3	5	G	3	6	6
	U	C	7	3	5	G	3	6	6
HOU364	V	C	7	3	5	G	3	6	6
	W	C	7	3	5	G	3	6	6

Figura 28.- Haplotipos *GDAP1* asociados con la mutación *p.Q163X*. La figura muestra los haplotipos obtenidos para los 17 cromosomas españoles (A hasta Q) y los 6 cromosomas hispanoamericanos (R hasta W) portadores de la mutación *p.Q163X*. En rojo se muestran las variantes alélicas en diferentes marcadores microsatélites con respecto al haplotipo ancestral común. En el marcador *D8S279* se observa una gran variabilidad. En función del alelo presente en el SNP *rs1025928* se indica si la variación probablemente se debe a mutación (azul) o recombinación (verde.)

Tabla 22.- Frecuencias alélicas de los marcadores microsatélites D8S551 y D8S1474 de población general caucasiana y española.

D8S551

ALELOS (GDB)	TAMAÑO (PB)	FRECUENCIA POBLACIÓN CAUCASIANA (%)	FRECUENCIA POBLACIÓN ESPAÑOLA (%)
1	267	1.92	8.06
2	253	48.08	2.68
4	285	3.85	28.49
5*	263	32.69	24.19
7	255	1.92	32.79

5*, alelo mayoritario en 16 de los 17 cromosomas portadores de la mutación p.Q163X.

D8S1474

ALELOS	TAMAÑO (PB)	FRECUENCIA POBLACIÓN ESPAÑOLA (%)
1	192	3.32
2	188	24.73
3*	184	26.88
4	180	30.10
5	176	9.60
6	160	2.68
7	148	2.15

3*, alelo mayoritario en 14 de los 17 cromosomas portadores de la mutación p.Q163X. Para este marcador no pudimos comparar las frecuencias alélicas obtenidas en población caucasiana al no disponer de ellas en la base de datos (<http://www.gdb.org>).

Las variaciones alélicas observadas en 4 de los 17 cromosomas portadores de la mutación p.Q163X, para los marcadores microsatélites D8S551 y D8S1474, podrían ser producidas por mutación como resultado de cambios en el número de

Resultados

repeticiones. Así, sugerimos que los 3 haplotipos (cromosomas C, F, N y O) representan variaciones del haplotipo ancestral común.

En las tres familias hispanoamericanas encontramos que compartían el haplotipo núcleo 5-G-3, y cuatro de los seis cromosomas compartían completamente el haplotipo extendido más frecuente en las familias españolas.

Con estos datos, postulamos que la mutación p.Q163X se originó en la península ibérica y, que los pacientes de nuestra serie de estudio y familias que segregan con el fenotipo CMT4A son consecuencia de un efecto fundador. Para confirmar esta hipótesis, extendimos el análisis de haplotipos con otros 4 marcadores microsatélites más (D8S279, D8S286, D8S1829 y D8S84). El análisis de los 6 marcadores microsatélites sugiere la presencia de un haplotipo ancestral común: **7-3-5-G-3-6-6** (fig.28).

Ocho de los 17 cromosomas portadores de la mutación p.Q163X comparten el haplotipo completo, mientras que en los 9 cromosomas restantes encontramos variaciones en algunos marcadores microsatélites (fig.28). El cromosoma C (fig.28) presenta diferentes alelos para los marcadores microsatélites D8S286 (el alelo 2 representa un 12% de los cromosomas de población general caucásiana a diferencia del alelo 3 que representa un 22%) y D8S1829 (el alelo 5 representa un 9% de los cromosomas de población general caucásiana a diferencia del alelo 6 que representa un 4%). En ambos casos cabe interpretar que se trata de sucesos mutacionales de los marcadores.

Sin embargo, la mayor variabilidad alélica la encontramos para el marcador microsatélite D8S279 (fig.28), en el que se han descrito 10 alelos en población general caucásiana (tabla 23). El alelo 7 aparece en nueve cromosomas (A, B, C, D, I, J, K, L y M) de los 17 portadores de la mutación p.Q163X (fig.28), y se encuentra en un 8% de los cromosomas de población general caucásiana. Los alelos 5 y 6, cuya frecuencia en la población general caucásiana es del 7% y 8%

respectivamente, aparecen en 4 (E, F, N y O) y 3 (G, P y Q) cromosomas respectivamente, y el alelo 3 cuya frecuencia en la población caucasiana es del 10% aparece en un cromosoma (cromosoma H). Puesto que postulamos que el haplotipo ancestral común es: **7-3-5-G-3-6-6**, para determinar si la variación en el locus del marcador D8S279 que da lugar a 3 haplotipos diferentes es generada por recombinación (la distancia entre los marcadores microsatélites D8S279 y D8S286 es 21 Mb) o por mutación en el número de repeticiones, extendimos el genotipo del locus D8S279 con el análisis de SNPs (*single nucleotide polymorphism*) ligados a dicho locus. Decidimos realizar el análisis de SNPs, en lugar de seleccionar otros marcadores microsatélites, con el objeto de reducir el riesgo de posibles mutaciones, porque la recombinación es mínima y puesto que no cambian mucho de una generación a otra, es sencillo seguir su evolución en estudios de poblaciones.

Tabla 23.- Frecuencias alélicas del marcador flanqueante D8S279.

ALELOS (GDB)	TAMAÑO (PB)	FRECUENCIA POBLACIÓN CAUCASIANA (%)
1	229	21.00
2	231	12.00
3	235	10.00
4	239	7.00
5	241	7.00
6	243	8.00
7	245	8.00
8	247	17.00
9	249	3.00
10	257	1.00

Frecuencias alélicas obtenidas en población caucasiana de la base de datos (<http://www.gdb.org>).

Seleccionamos de la base de datos, UCSC Human Genome Browser, Genome Working Draft, <http://genome.ucsc.edu/goldenPath/septTracks.html>, los

Resultados

SNPs rs1025928 y rs959424 (ver pág. 77 de material y métodos), cuya localización física se muestran en la figura 29. Los resultados obtenidos para el SNP rs959424 no fueron informativos, ya que los 17 cromosomas portadores presentaron el mismo alelo (alelo C). Sin embargo, al genotipar el SNP rs1025928 (el alelo T representa el 70% y el alelo C el 30% en la población general) en nuestros pacientes portadores de la mutación p.Q163X, observamos 5 segregaciones alélicas para ambos marcadores genéticos (rs1025928-D8S279): C-7, T-5, C-5, T-3 y C-6. Postulamos que el haplotipo corto C-7 representa al haplotipo ancestral al estar presente en el haplotipo extendido C-7-3-5-G-3-6-6. Así pues, interpretamos que cuando las variaciones alélicas observadas para el marcador microsatélite D8S279 están asociadas con el alelo C, se habrían producido como consecuencia de un proceso de mutación (cromosomas E, G, N, O, P y Q) mientras que, cuando están asociadas con el alelo T se habrían producido como consecuencia de un evento de recombinación (cromosomas F y H).

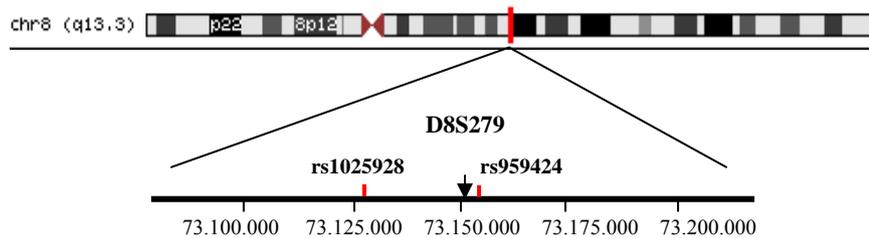


Figura 29.- Localización física del marcador microsatélite D8S279 y de los SNPs rs1025928 y rs959424. La posición del marcador D8S279 está indicado con una flecha negra, situado en el cromosoma 8, banda 8q13.3 y cuya localización física es 73.150.567-73.150.901. Los SNPs están indicados con una línea de color rojo; ambos localizados en el cromosoma 8, banda 8q13.3 y cuya posición es 73.125.812 (rs1025928) y 73.152.107 (rs959424).

Durante la realización de esta tesis, Boerkoel y colaboradores (2003), publicaron los resultados de tres familias norteamericanas (Texas) de origen hispanoamericano, cuyos pacientes eran homocigotos para la mutación p.Q163X.

Dos de las familias eran originarias de Costa Rica (HOU364 y HOU726) y una de ellas de Perú (HOU1363). Dado que habíamos postulado, que la mutación p.Q163X se originó en la península ibérica y, que los pacientes de nuestra serie de estudio y familias que segregan con el fenotipo CMT4A son consecuencia de un efecto fundador, nos dispusimos a confirmar nuestra hipótesis de estudio comparando los resultados obtenidos en nuestras familias con respecto a los resultados obtenidos para estas tres familias norteamericanas de origen hispanoamericano. En las tres familias, los 5 pacientes eran homoalélicos para la mutación p.Q163X y por tanto, podíamos analizar 6 cromosomas portadores de la mutación. Tras la construcción del haplotipo extendido, rs1025928-D8S279-D8S286-D8S551-C.507T/G-D8S1474-D8S1829-D8S84, observamos que 4 cromosomas (T, U, V y W) correspondientes a las familias HOU364 y HOU726 presentaban el haplotipo común C-7-3-5-G-3-6-6. Los otros dos cromosomas (R y S) correspondientes a la familia HOU1363 mostraban diferencias alélicas para los marcadores proximales rs1025829 y D8S279 (fig.28).

Así pues, estos datos confirman que la mutación p.Q163X en pacientes ubicados en ambos lados del Atlántico, tienen un origen ancestral común y sugiere la existencia de un efecto fundador para la mutación p.Q163X en la península ibérica. Sorprendentemente, observamos las mismas variaciones alélicas para el locus D8S279, de modo que el cromosoma R mostraba el mismo haplotipo que el cromosoma H, al igual que el cromosoma S con el cromosoma E, N y O. Estos datos sugieren dos posibles hipótesis sobre la migración:

1. La mutación p.Q163X migró desde España hacia América, probablemente asociada con el alelo 7, y las variaciones aparecieron posteriormente como consecuencia de procesos de mutación o eventos de recombinación.
2. La mutación p.Q163X llegó a América como consecuencia de más de un movimiento migratorio.

Resultados

El análisis de haplotipos también fue estudiado para las otras mutaciones encontradas en nuestra serie de estudio: p.S194X, p.T288fsX3 y p.R120W, presentes cada una de ellas en dos cromosomas. La construcción del haplotipo lo realizamos en base a los mismos seis marcadores microsatélites polimórficos (D8S279, D8S286, D8S551, D8S1474, D8S1829 y D8S84) ligados al locus CMT4A, que abarcan una región de ~2.83 Mb y el SNP c.507T>G (fig.27). Observamos que cada mutación podría estar asociada a un haplotipo común confirmando un único origen para cada una de ellas.

La mutación p.S194X, presente en dos cromosomas (LF127 y LF249) se asocia a un haplotipo común, desde el marcador D8S551 hasta el marcador D8S84, en los dos cromosomas españoles, presentando variaciones alélicas con respecto a los marcadores microsatélites proximales D8S286 y D8S279 (fig.30).

Mediante el estudio del haplotipo extenso en una familia de origen marroquí (PN860) confirmamos que la mutación p.S194X tiene un origen común en España y Marruecos, como previamente nuestro grupo había propuesto (Nelis *et al.*, 2002).

Familia	Cromosomas	Marcadores flanqueantes 5'			SNP	Marcadores flanqueantes 3'		
		D8S279	D8S286	D8S551	c.507T>G	D8S1474	D8S1829	D8S84
LF249	A	3	4	2	T	1	5	5
LF127	B	7	3	2	T	1	5	5
PN860	C	6	4	2	T	1	5	5
	D	6	4	2	T	1	5	5

Figura 30.- Haplotipos GDAP1 asociados con la mutación p.S194X. La figura muestra los haplotipos obtenidos para los 2 cromosomas españoles (A y B) y los 2 cromosomas de origen marroquí (C y D) portadores de la mutación p.S194X. En rojo se muestran las variantes alélicas en diferentes marcadores microsatélites con respecto al haplotipo común.

Los dos cromosomas españoles portadores de la mutación p.T288fsX3, pertenecientes a las familias LF20 y LF127, muestran un haplotipo común entre los marcadores D8S279 y c.507T>G, pero muestran diferencias alélicas con respecto a los marcadores más distales (fig.31). Este hecho sugiere que pudo ocurrir un evento de recombinación entre el gen *GDAP1* y el marcador microsatélite D8S1474.

Familia	Cromosomas	Marcadores flanqueantes 5'			SNP	Marcadores flanqueantes 3'		
		D8S279	D8S286	D8S551	c.507T>G	D8S1474	D8S1829	D8S84
LF249	A	5	3	5	T	1	6	7
LF127	B	5	3	5	T	2	5	6

Figura 31- Haplotipos *GDAP1* asociados con la mutación p.T288fsX3. La figura muestra los haplotipos obtenidos para los 2 cromosomas españoles portadores de la mutación p.S194X. En rojo se muestran las variantes alélicas en diferentes marcadores microsatélites con respecto al haplotipo común, como posible consecuencia de un evento de recombinación.

Los 2 cromosomas españoles portadores de la mutación p.R120W, pertenecientes a las familias LF292 y LF293, muestran que la mutación está asociada con un haplotipo común, construido en base a los seis marcadores microsatélites ligados al locus CMT4A y el SNP exónico c.507T>G (fig.32).

Familia	Cromosomas	Marcadores flanqueantes 5'			SNP	Marcadores flanqueantes 3'		
		D8S279	D8S286	D8S551	c.507T>G	D8S1474	D8S1829	D8S84
LF292	A	7	3	5	T	4	6	6
LF293	B	7	3	5	T	4	6	6

Figura 32.- Haplotipos *GDAP1* asociados con la mutación p.R120W. La figura muestra los haplotipos obtenidos para los 2 cromosomas españoles (A y B) portadores de la mutación p.R120W.

4.2.- ANÁLISIS DE EXCLUSIÓN DE GENES CANDIDATO.

Tras al análisis de mutaciones en las 118 familias diagnosticadas con la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, en 94 de ellas se habían descartado los siguientes loci descritos: CMT1A (*PMP22*), CMT1B (*MPZ*) y CMTX (*GJB1* o *Cx32*). Detectamos mutaciones en el gen *GDAP1* en 8 casos esporádicos pertenecientes a 8 familias no emparentadas entre sí portadores de 2 mutaciones y con un patrón de herencia autosómico recesivo (LF127, LF135, VAL.3, VAL.4, VAL.5, VAL.25, VAL.28, VAL.29), y 2 familias (LF292 y LF293) y un caso esporádico (VAL.8) con una única mutación. En las 107 familias restantes no encontramos mutaciones en el gen *GDAP1* y por tanto, descartamos el locus CMT4A.

A partir de los resultados obtenidos nos planteamos la elección de posibles genes candidatos con el objeto de identificar genes responsables de enfermedad. En primer lugar, hasta el momento no se habían descrito familias con una única mutación en el gen *GDAP1* como la causa de CMT4A, sugiriendo así que podría expresarse de forma dominante, como describimos en 2 familias (LF292 y LF293) y un caso esporádico (VAL.8) de nuestra serie de estudio. Ante este resultado, nos planteamos la posibilidad de que mutaciones en otros genes próximos al locus CMT4A pudieran estar condicionando dicho fenotipo clínico. Consultamos las bases de datos (<http://www.genome.ucsc.edu> y <http://ncbi.nlm.nih.gov>) y observamos que el gen *PMP2* estaba localizado en la misma región cromosómica (8q21.3-22.1) y por su expresión en el sistema nervioso periférico, podía ser a priori un buen gen candidato (fig.33).

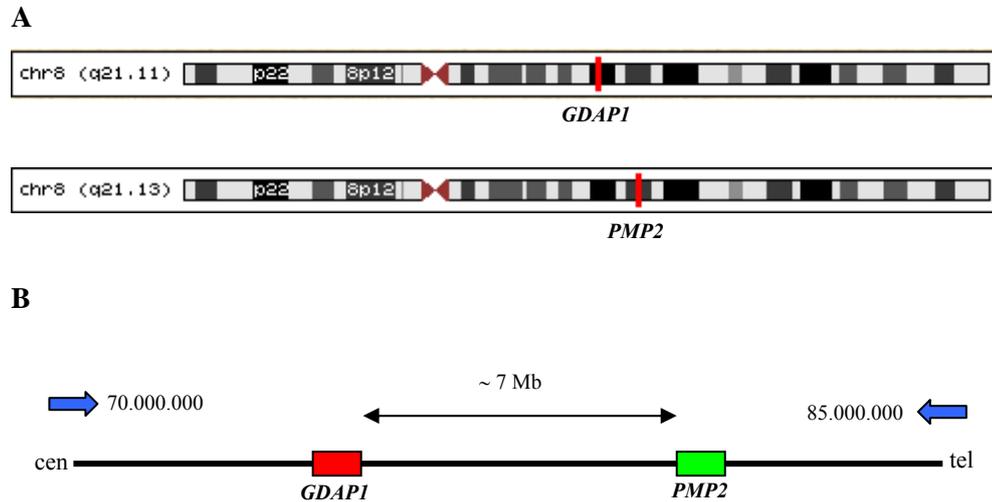


Figura 33.- Localización física y cromosómica de los genes *GDAP1* y *PMP2*. A: muestra la posición cromosómica de los genes *GDAP1* y *PMP2*, indicada con una línea vertical de color rojo, ambos localizados en el brazo largo (q) del cromosoma 8 en la banda q21.11 y q21.13, respectivamente. B: muestra la distancia física entre el gen *GDAP1* (indicado con un rectángulo de color rojo) y el gen *PMP2* (indicado con un rectángulo de color verde) que es de ~7 Mb. La posición física del gen *GDAP1* es 75.425.252-75439.157, mientras que la del gen *PMP2* es 82.515.121-82.522.274.

En segundo lugar, en las 107 familias diagnosticadas con la enfermedad de CMT que resultaron negativas para el análisis de mutaciones en el gen *GDAP1*, seleccionamos el gen *GDAPILI*, localizado en el cromosoma 20q12, como posible gen candidato, en base a que la proteína que codifica dicho gen es similar a la secuencia de la proteína de *GDAP1* humana y se trata, pues, de un gen parálogo de *GDAP1* (fig.34).

Tras la elección de ambos genes candidatos, *PMP2* y *GDAPILI*, seleccionados por su expresión o por similitud de secuencia proteica respectivamente, nos dispusimos a demostrar que pudieran estar asociados con la enfermedad de CMT mediante la búsqueda de mutaciones puntuales específicas.

Resultados

```
GDAP1      -----MARRQEEQRGSP---PLRGKGKADAEVK---LI LYHWTHSFSSQK
GDAP1L1    MATPNNLTPTNCSSWWPISALESDAAKPAEAPDAPEAASPAHWPRESLV LYHWTSQSFSSQK

GDAP1      VRLVIAEKALKCEGHVSLPLSEHNEPWFMRNLNSTGEVVPVLIHGENTICEATQIIDYLEQ
GDAP1L1    VRLVIAEKGVLVCEERDVSLPQSEHKPEPWFMRNLNLGEEVVPVLIHRDNII SDYDQIIDYVER

GDAP1      TFLDERTPRLMPDKESMYYPVQHYRELLDSLPMDAYTHGCILHPELTVDSMIPAYATR
GDAP1L1    TFTGEHVVALMPEVGS LQHARVLQYRELLDALPMDAYTHGCILHPELTTDSMIPKYATAE

GDAP1      IRSQIGNTESELKLA-EENPDLQEAYIAKQKRLKSKLLDHDNVKYLKKILDELEKVLDDQ
GDAP1L1    IRRHLANATTDLMKLDHEEEPQLSEPYLSKQKKLMAKILHDDVSYLKKILGELAMVLDDQ

GDAP1      VETELQRNEETPEEGQPWLCGESFTLADVSLAVTLHRLKFLGFARRNWGNGKRPNLET
GDAP1L1    IEAELTKRKLKLENEGQKCEWLWCGCAFTLADVLLGATLHRLKFLGSLSKKYWEDGSRPNLQS

GDAP1      YYERVLKRKTFNFKVLGHVNNILISAVLPTAFRVAKKRAPKVLGTTLVVGLLAGVGYFAFM
GDAP1L1    FFERVQRRFAFRKVLGDIHTTLLSAVIPNAFRLVKRKPPSFFGASFLMGSLLGGMGYFAFW

GDAP1      LFRKRLGSMILALRPRPNYF
GDAP1L1    YLKKKY---I-----
```

Figura 34.- Alineamiento de las secuencias proteicas correspondientes a los genes *GDAP1* (*Q8TB36*) y *GDAP1L1* (*Q96MZ0*). En rojo se muestra la secuencia de aminoácidos coincidentes en ambas proteínas correspondientes a la secuencia codificante del exón 1, en verde a la secuencia codificante del exón 2, en morado a la secuencia codificante del exón 3, en amarillo a la secuencia codificante del exón 4, en azul oscuro a la secuencia codificante del exón 5 y en azul claro a la secuencia codificante correspondiente al exón 6. En gris aparecen las secuencias de aminoácidos que difieren respecto a ambas proteínas.

4.2.1.- Análisis de mutaciones en el gen *PMP2*

El gen de la proteína de la mielina 2 (*PMP2*) fue localizado en 8q21.3-q22.1 que es la misma región cromosómica donde se localiza el locus *CMT4A* (Hasayaka *et al.*, 1993a) y además también se expresa en el sistema nervioso periférico. Debido a que en dos familias (LF292 y LF293) y en un caso esporádico correspondiente a la familia VAL.8 encontramos una única mutación en el gen *GDAP1* y parecen segregar con la enfermedad de un modo dominante, nos planteamos descartar la posibilidad de que la existencia de mutaciones en el gen *PMP2* pudieran estar condicionando el fenotipo en estos pacientes y por tanto, no podríamos hablar de un modo de herencia autosómico dominante sino más bien de

la co-expresión de ambos genes como responsables de la enfermedad en estos pacientes. Con el fin de confirmar o descartar nuestra hipótesis de trabajo, nos dispusimos al análisis de mutaciones del gen *PMP2* que presenta una ORF (*open reading frame*) de 393 pb y codifica una proteína de 131 aminoácidos. La secuencia genómica del gen *PMP2*, el cual se expande ~8 Kb, consta de 4 exones (Hasayaka *et al.*, 1993a) (fig.35).

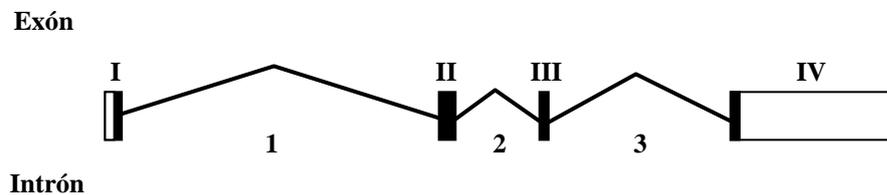


Figura 35.- Organización genómica del gen *PMP2* humano. Estructura del gen en intrones y exones. Los exones codificantes se representan con rectángulos en negro y las secuencias no codificantes están en blanco, mientras que los intrones se representan con una línea negra quebrada que conecta los exones.

Procedimos a amplificar los cuatro exones del gen y las regiones flanqueantes mediante la técnica de la PCR en todos los pacientes de las familias LF292 y LF293, y del caso esporádico perteneciente a la familia VAL.8. El análisis de los SSCPs no mostró ningún cambio en los productos de los cuatro exones. Para descartar totalmente este gen como candidato decidimos secuenciar los cuatro exones del gen en los probandos correspondientes a cada una de las tres familias no encontrando ninguna mutación, excluyendo definitivamente el gen *PMP2* como posible co-responsable de la enfermedad. Con estos datos, podríamos inferir en estas dos familias y un caso esporádico, que la única mutación encontrada en el gen *GDAP1* sería la responsable del fenotipo CMT axonal. Este fenotipo CMT axonal con herencia autosómica dominante se le ha asignado el nombre de CMT tipo 2K (MIM: 214400).

4.2.2.- Análisis de mutaciones en el gen *GDAP1L1*

El gen *GDAP1L1* (*Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1-like 1*) está localizado en el cromosoma 20q12. La secuencia está formada por una ORF de 2281 nt, con una región 5' UTR formada por 67 nt y una región 3' UTR de 1071 nt, que codifica para una proteína de 367 aminoácidos. Este gen está formado por seis exones (fig.36a y fig.36b).

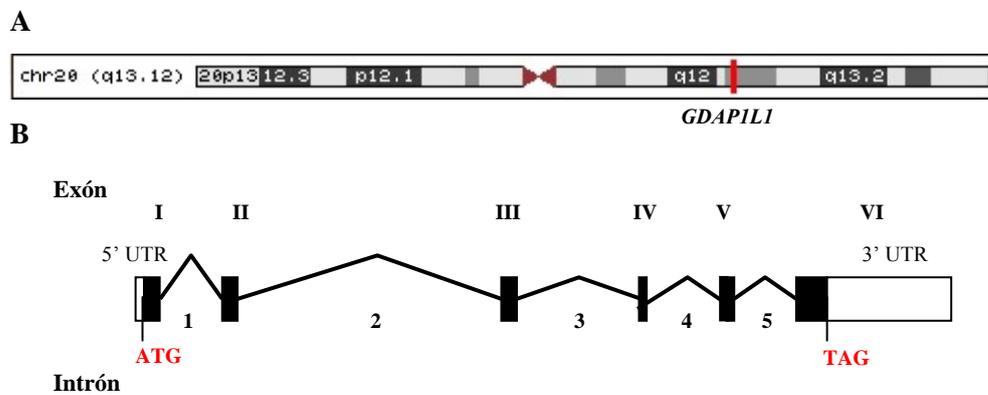


Figura 36a.- Localización y estructura del gen *GDAP1L1*. A: muestra la localización física del gen *GDAP1L1* en el cromosoma 8q13.12, indicado con una línea de color rojo. B: estructura del gen *GDAP1L1* formado por 6 exones y 5 intrones. Los exones codificantes se representan con rectángulos en negro y las secuencias no codificantes están en blanco, mientras que los intrones se representan con una línea negra que conecta los exones.

C

	1	2	3	4	5	6
EXÓN	180 pb	193 pb	173 pb	98 pb	115 pb	344 pb
INTRON	9738 pb	1088 pb	4622 pb	1117 pb	14397 pb	-

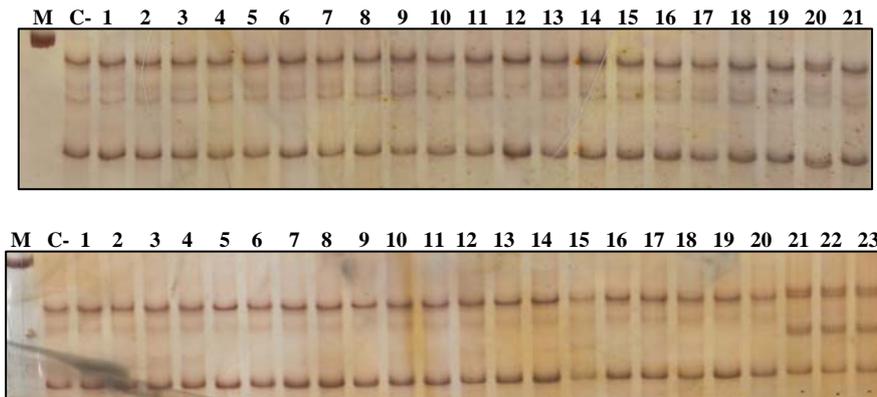
Figura 36b.- Localización y estructura del gen *GDAP1L1*. C: tabla que muestra los tamaños correspondientes a los exones e intrones del gen *GDAP1L1*.

El estudio del análisis de mutaciones en el gen *GDAP1LI* lo realizamos en un total de 117 pacientes pertenecientes a 107 familias diagnosticados con la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, sin distinguir entre formas desmielinizantes y/o axonales. La serie se distribuye como sigue: 83 casos esporádicos, 17 familias con herencia autosómica recesiva y 7 familias que no presentaban un patrón de herencia claro y no se podía descartar o era compatible con un patrón de herencia dominante. Los seis exones y regiones flanqueantes del gen *GDAP1LI* fueron amplificados a partir de ADN genómico utilizando cebadores específicos derivados de los extremos 5' y 3' de las secuencias intrón-exón (ver tabla 7 de material y métodos). El análisis de SSCPs no mostró ningún cambio en los productos correspondientes a los exones 1, 2, 3, 5 y 6 en los 117 pacientes estudiados. Por el contrario, el análisis del exón 4 mostró dos patrones de bandas diferentes respecto a la muestra control (fig.37). Uno de ellos aparece en dos casos esporádicos (LF211 y LF295) mientras que el otro, aparece en cuatro casos esporádicos (LF307, LF316, LF358 y LF373) y una familia (VAL.10) con dos pacientes, todos ellos con un modo de herencia autosómico recesivo. Tras la secuenciación directa del producto de PCR purificado correspondiente al exón 4 del gen *GDAP1LI* observamos que uno de los patrones presente en dos casos esporádicos correspondía al cambio E199K (c.595G>A): el ácido glutámico cambia a lisina en la posición 199. En principio, al tratarse de aminoácidos con carga distinta pensamos que podía tratarse de un cambio patogénico; sin embargo, al analizar 168 cromosomas de población control española dicho cambio estaba presente en un 1.2% (alelo A), lo que sugería que se trataba de un polimorfismo de baja frecuencia en la población española. Así, el alelo G se encontró en 98.8% de los cromosomas de población española. El segundo patrón presente en cuatro casos esporádicos y dos pacientes afectados pertenecientes a la misma familia, tras la secuenciación directa observamos que se trataba del cambio sinónimo S240S (c.612C>T). Este polimorfismo, tras el análisis de 168 cromosomas de población española fue

Resultados

encontrado en un 2.4% (alelo T) por tanto el alelo C estaba presente en el 97.6% restante.

A



B

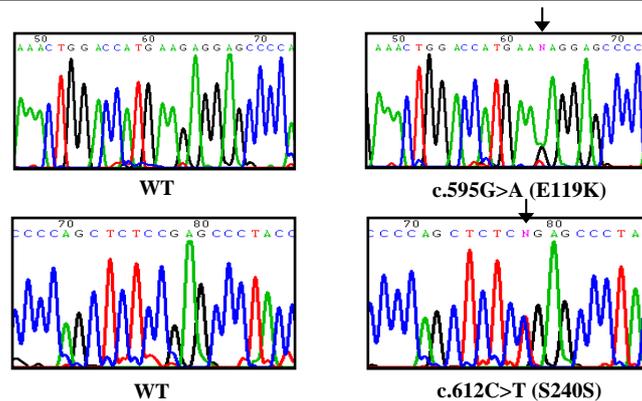


Figura 38.- Análisis de los polimorfismos p.E199K y p.S240S en el gen *GDAP1L1*. A: Detección de los polimorfismos p.E199K (gel superior) y p.S240S (gel inferior) mediante la técnica de SSCPs. M: marcador de pesos moleculares 1Kb; C-: control individuo sano; Gel superior, línea 20: probando de la familia LF211 (alelo A) y líneas de 1 a 19 y 21: casos índice pertenecientes a otras familias (alelo G). Gel inferior, líneas 21, 22 y 23: probandos de las familias LF307, LF316, LF358 (alelo T) y líneas de 1 a 20: casos índice pertenecientes a otras familias (alelo C). B: electroforegramas de los polimorfismos E119K y S240S en el exón 4 del gen *GDAP1L1*.

Con estos resultados y con el objeto de descartar definitivamente el gen *GDAP1L1* como gen candidato, realizamos la secuenciación directa del resto de exones (1, 2, 3, 5 y 6) que conforman el gen en los 6 casos esporádicos y el probando de la familia VAL.10, no encontrando ningún cambio. Así pues, se

vuelve a poner de manifiesto la gran heterogeneidad clínica y genética de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth en estas 107 familias en las que no hemos podido definir la causa de la enfermedad mediante esta aproximación de análisis de genes candidatos.

4.3.- ANÁLISIS GENÉTICO Y MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD DE CHARCOT-MARIE-TOOTH AUTOSÓMICA RECESIVA EN FAMILIAS DE ETNIA GITANA.

En la población gitana la mayoría de casos diagnosticados con la enfermedad de CMT desmielinizante y con un modo de herencia autosómica recesiva están causados por mutaciones fundacionales (Kalaydjieva *et al.*, 2005; Morar *et al.*, 2004). Dentro de las formas recesivas denominadas CMT4, en población gitana se han descrito tres neuropatías hipo/desmielinizantes: HMSN-Lom (CMT4D), HMSN-Russe (CMT4G) y CCFDN (síndrome de neuropatía congénita con dimorfismo facial y cataratas).

Las formas HMSN-Lom y la HMSN-Russe presentan un fenotipo clínico muy parecido con debilidad muscular distal, pérdida sensitiva, amiotrofia y deformidades en los pies y las manos. Las principales diferencias se refieren a la edad de aparición, progresión de la enfermedad y velocidades de conducción. La HMSN-Lom es de aparición temprana (~18 meses de edad) con una progresión rápida de la enfermedad, VCN extremadamente reducidas y está asociada con sordera, mientras que la HMSN-Russe aparece más tarde (~11 años de edad) es de progresión lenta, con VCN moderadamente reducidas y no está asociada con sordera. El síndrome CCFDN presenta un fenotipo clínico muy particular con la aparición de cataratas congénitas y microcórneas, dimorfismo facial, pequeña estatura, retraso mental e hipogonadismo.

Disponíamos de una serie de 8 familias no emparentadas entre sí, con un total de 20 pacientes y 9 casos esporádicos. Los 29 pacientes (14 varones y 15 mujeres) estaban diagnosticados de una neuropatía sensitivo-motora

Resultados

desmielinizante y con un patrón de herencia autosómico recesivo. Todos ellos eran de etnia gitana y de origen español, procedentes en su gran mayoría de la cuenca mediterránea. Los estudios clínicos, electrofisiológicos y, en ocasiones, anatomopatológicos en los pacientes de nuestra serie de estudio fueron realizados o supervisados por el Servicio de Neurología del Hospital Universitario La Fe de Valencia, observando diferentes fenotipos clínicos: aparición temprana (1ª década de vida) o más tardía de la enfermedad (finales 1ª o principio 2ª década de vida), retraso en el desarrollo motor y dificultad para caminar, caídas frecuentes, deformidades en pies y manos, atrofia muscular distal y ataxia sensitiva, progresión muy agresiva de la enfermedad o progresión lenta, VCN moderadas o reducidas, sordera en un caso y escoliosis en varias familias y casos esporádicos. De los 29 pacientes ninguno presentaba el fenotipo clínico descrito en el síndrome de neuropatía congénita con dimorfismo facial y cataratas (CCFDN).

Nos planteamos varios objetivos. En primer lugar, el estudio de los loci conocidos asociados con la enfermedad de CMT a población gitana: i) análisis de la mutación p.R148X en el gen *NDRG1* responsable de la forma HMSN-Lom en el cromosoma 8q24 en población de etnia gitana; ii) análisis de ligamiento y de haplotipos al locus HMSN-Russe en el cromosoma 10q23. En segundo lugar, debido a la variabilidad fenotípica mostrada en la mayoría de nuestras familias y casos esporádicos, tras revisar la bibliografía observamos que el locus CMT4C descrito únicamente en población no gitana (Senderek *et al.*, 2003c) presentaba un fenotipo clínico muy similar al descrito en un subgrupo de nuestras familias y casos esporádicos. Por ello decidimos estudiar el locus CMT4C: i) análisis de ligamiento y de haplotipos al locus CMT4C en el cromosoma 5q23-q33; ii) análisis de mutaciones en el gen *SH3TC2*.

4.3.1.- ESTUDIO DE LOCI CONOCIDOS ASOCIADOS A POBLACIÓN GITANA CON LA ENFERMEDAD CMT: HMSN-LOM (CMT4D) Y HMSN-RUSSE (CMT4G)

4.3.1.1.- Análisis de la mutación p.R148X en el gen NDRG1 responsable de la forma HMSN-Lom en el cromosoma 8q24 en población de etnia gitana.

La HMSN-Lom es una de las neuropatías más comunes en la población gitana con casos descritos en toda Europa. La mutación Lom se describió originariamente en Bulgaria cuya frecuencia génica se estima en 1.5% y se da en homocigosis en todos los pacientes. La distribución entre diferentes grupos endogámicos de población gitana es muy variable con un ratio de portadores que va desde el 0% hasta el 15% (Kalaydjieva L. *et al.*, 2005). La HMSN-Lom en población gitana está causada por una única mutación ancestral, p.R148X, en el gen *NDRG1* (*N-myc downstream-regulated gene 1*) localizado en el cromosoma 8q24. La mutación Lom es una transición C>T en el nucleótido 564 que resulta en el cambio de una arginina por un codón de parada en la posición 148, en el exón 7 del gen *NDRG1*. Al estudiarla en nuestra serie de 8 familias (LF2, LF13, LF42, LF235/LF402, LF502, VAL.15 y VAL.21) y 9 casos esporádicos con herencia autosómica recesiva, encontramos en un caso esporádico (familia LF394) la mutación p.R148X en homocigosis. El análisis de la mutación en los padres mostraba que eran heterocigotos para ella mientras que el análisis en los hermanos sanos mostró que la hermana era portadora heterocigota sana mientras que el hermano no era portador de dicha mutación (fig.38). Del resto de pacientes estudiados, en total 28, ninguno presentaba la mutación. Debido a que todos los pacientes son de etnia gitana, podemos decir que la prevalencia de la mutación p.R148X asociada con HMSN-Lom en la serie de estudio, se observó en un 3.5% de los pacientes estudiados. Este resultado nos indica que aunque la mutación p.R148X se da mayoritariamente en familias de origen gitano, existen otras formas de CMT que afectan a este grupo étnico.

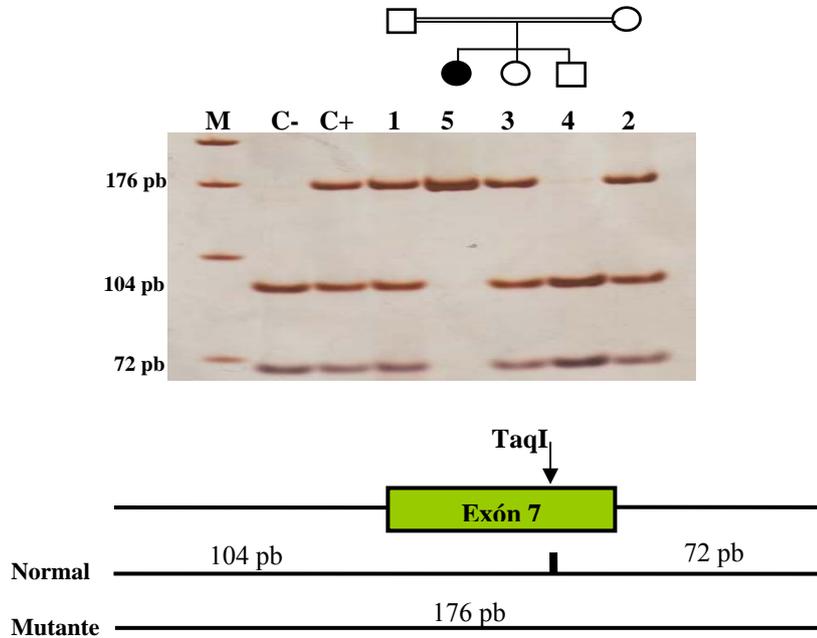


Figura 38.- Segregación de la mutación *Lom* en la familia LF394. La mutación *Lom*, p.R148X, en el exón 7 del gen *NDRG1* elimina un sitio de restricción *TaqI* con lo que las muestras que tienen la mutación no se produce la digestión del fragmento de 176 pb amplificado por PCR, en dos fragmentos de 104 y 72 pb. Carreras 1, 2, 3: pacientes heterocigotos sanos. Carrera 4: paciente sano. Carrera 5: paciente homocigoto enfermo. M: marcador de pesos moleculares pGEM; C-: control individuo sano; C+: control individuo heterocigoto sano.

4.3.1.2.- Análisis de segregación mediante el estudio de ligamiento y de haplotipos al locus *HMSN-Russe* en el cromosoma 10q23.

La variante *HMSN-Russe* (CMT4G) se describió originariamente en familias gitanas del norte de Bulgaria concretamente en la ciudad de Russe (Rogers *et al.*, 2000). Posteriormente, también se describió en familias gitanas rumanas y españolas (Thomas *et al.*, 2001). Se localiza en el cromosoma 10q23 y actualmente se desconoce el gen responsable de la enfermedad. El fenotipo clínico de la *HMSN-Russe* comienza con un debilitamiento distal de los miembros inferiores en edades comprendidas entre los 8-16 años y progresa afectando a los miembros

superiores en edades comprendidas entre los 10-43 años. Las velocidades de conducción motora aparecen ligeramente reducidas (32 m/s). La biopsia del nervio muestra una pérdida de las fibras largas mielinizadas, extremadamente delgadas y de regeneración profusa (Thomas *et al.*, 2001).

En nuestra serie inicial de 8 familias y 9 casos esporádicos, de etnia gitana y con un patrón de herencia autosómico recesivo, la HMSN-Lom fue excluida en todos los casos a excepción de un caso esporádico, LF394. Las 8 familias no emparentadas entre sí (LF2, LF13, LF42, LF235/LF402, LF302, LF502, VAL.15 y VAL.21), y 4 casos esporádicos (LF409, LF421, LF454 y VAL.9), en total 24 pacientes, fueron utilizados para el estudio de segregación al locus HMSN-Russe mediante la construcción de haplotipos y análisis de ligamiento bipuntual entre cada uno de los marcadores microsatélites utilizados en este estudio (fig.39), empleando el programa MLINK 5.1 del paquete FASTLINK 2.1. En los 4 casos esporádicos restantes (LF347, LF378, LF444 y LF476), debido a que sólo disponíamos del caso probando y no de datos familiares para seguir la información genética entre generaciones, únicamente realizamos la construcción del haplotipo.

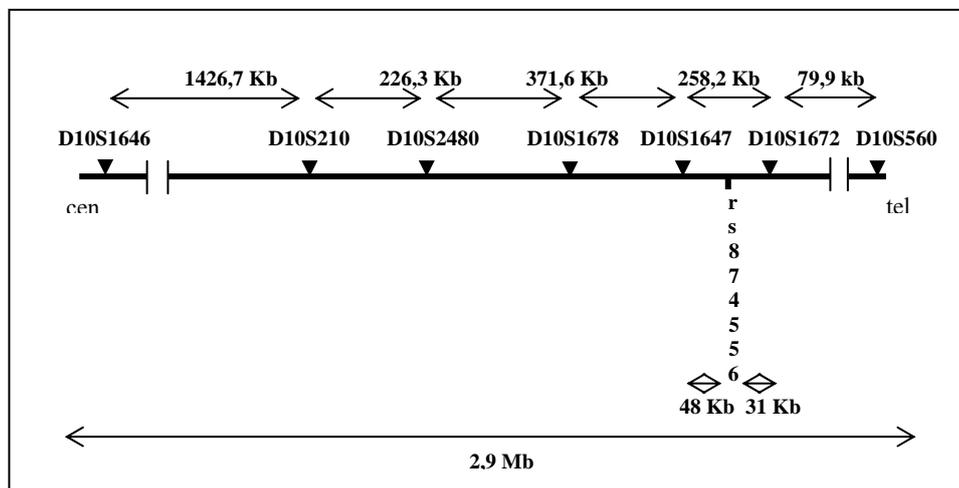


Figura 39. - Mapa físico del locus HMSN-Russe. La posición de los siete marcadores microsatélites ligados a este locus está indicada con una punta de flecha negra. Las flechas \leftrightarrow indican las distancias físicas de un marcador respecto a otro. El SNP rs874556 indica su posición con una línea vertical entre los marcadores microsatélites D10S1647 y D10S1672.

Resultados

Tras la construcción del haplotipo, cen-D10S1646-D10S210-D10S1647-D10S1672-D10S560-tel, observamos que 5 de las 8 familias (LF2, LF13, LF235/402, VAL.15, VAL.21), y el caso esporádico perteneciente a la familia LF454, no segregaban con la enfermedad, quedando excluidos para el locus HMSN-Russe (fig.40 y fig.41); Sin embargo, sí segregaban con la enfermedad las otras 3 familias (LF42, LF302 y LF502) y los 3 casos esporádicos (LF409, LF421 y VAL.9) incluidos en el estudio (fig. 42, fig. 43 y fig.44).

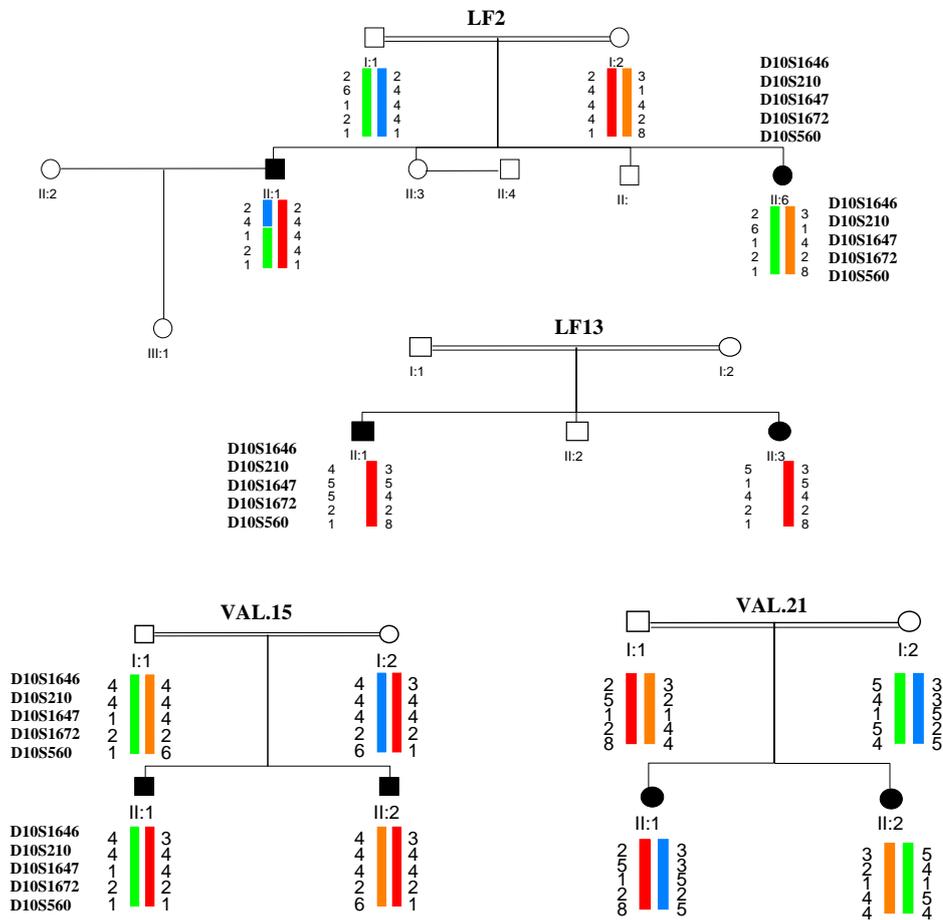


Figura 40.- Haplotipos de las familias LF2, LF13, VAL.15 y VAL.21 con los marcadores ligados al locus HMSN-Russe. En esta figura se observa que los miembros afectados en cada una de las familias no comparten el mismo haplotipo.

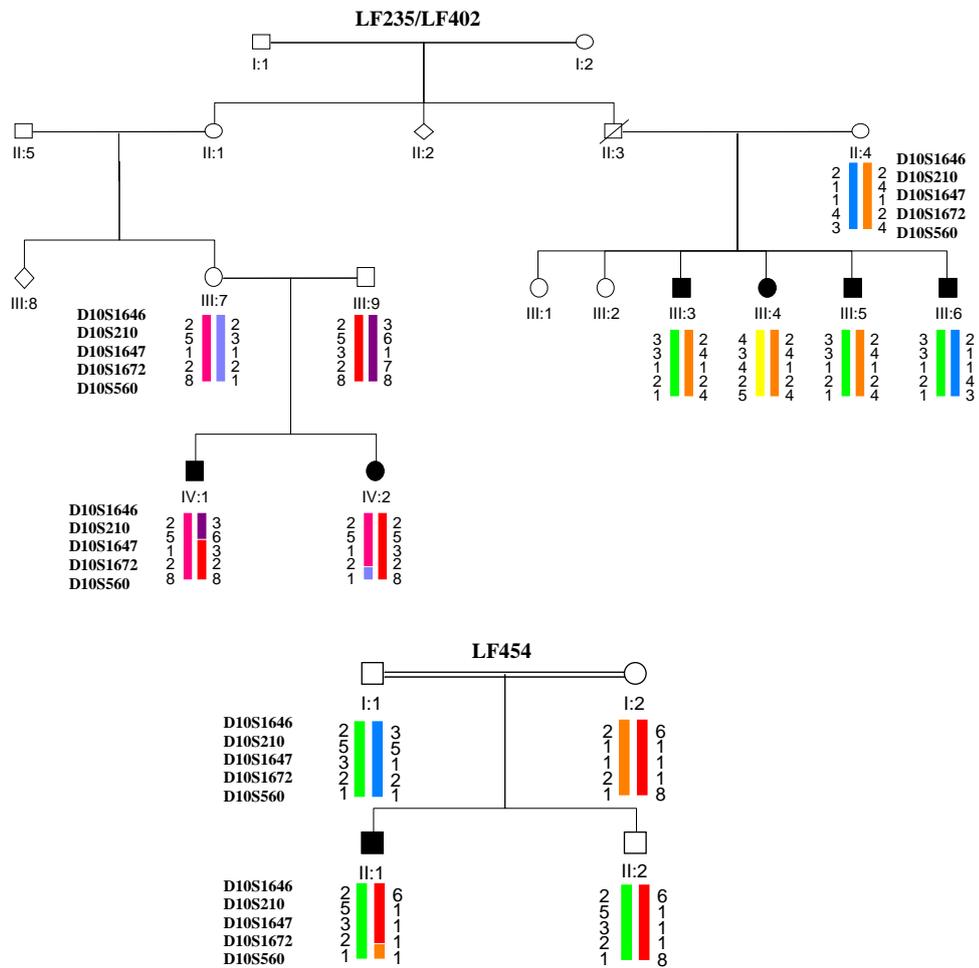


Figura 41.- Haplotipos de la familia LF235/LF402 y el caso esporádico LF454 con los marcadores ligados al locus HMSN-Russe. En esta figura se observa que los miembros afectados en la familia LF235/LF402 no comparten el mismo haplotipo, mientras que el caso esporádico perteneciente a la familia LF454 presenta el mismo haplotipo que su hermano sano.

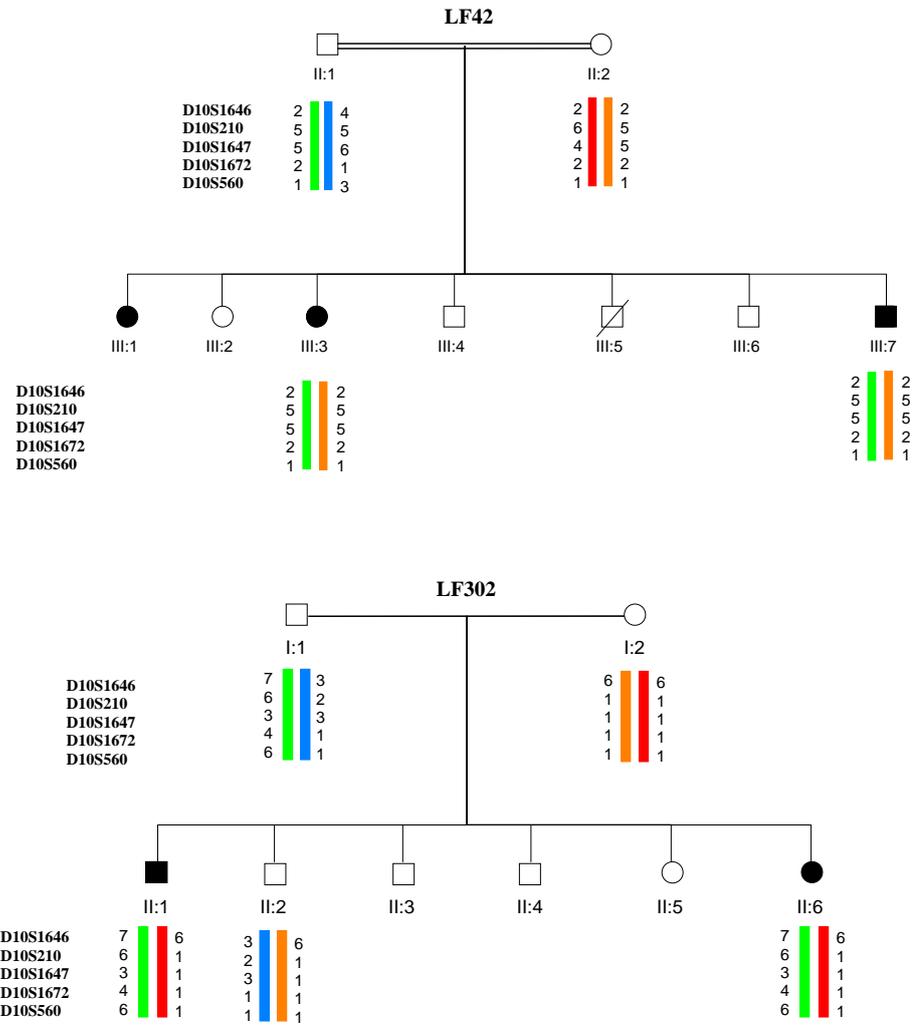


Figura 42.- Haplotipos de las familia LF42 y LF302 con los marcadores ligados al locus HMSN-Russe. En esta figura se observa que los miembros afectados en ambas familias segregan con la enfermedad.

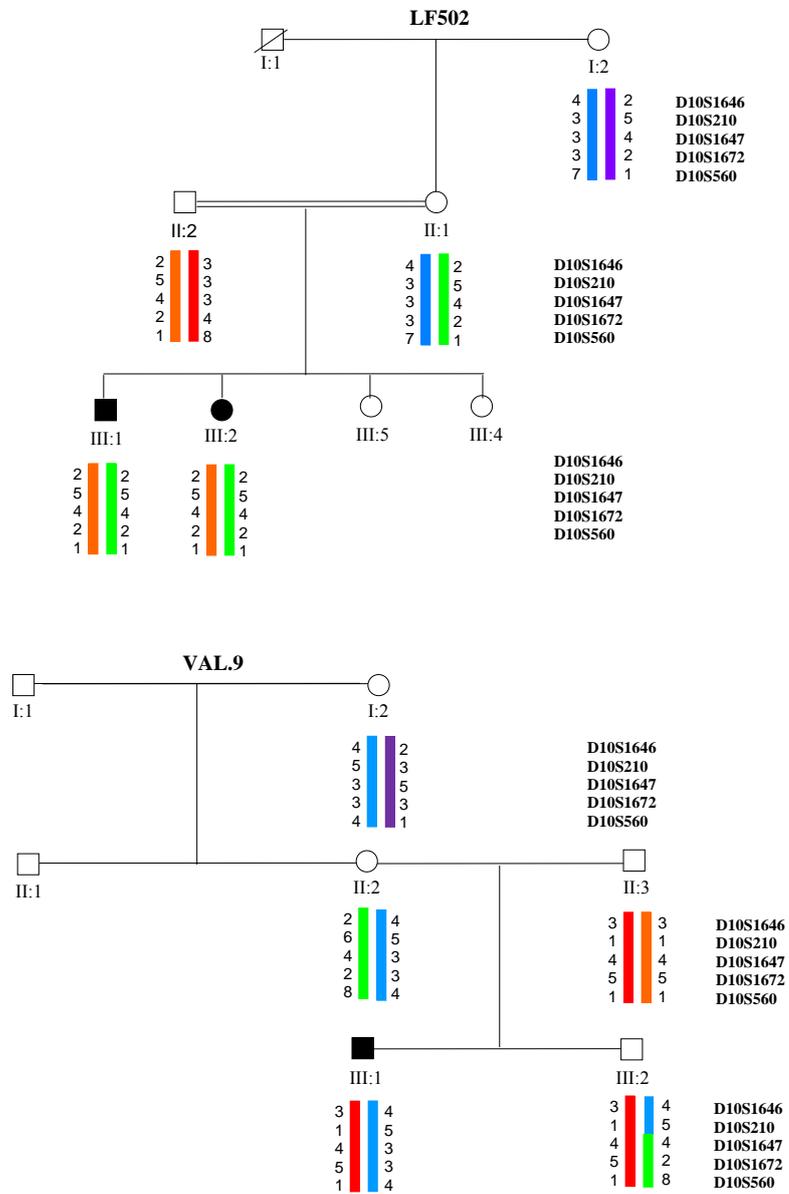


Figura 43.- Haplotipos de la familia LF502 y el caso esporádico VAL.9 con los marcadores ligados al locus HMSN-Russe. En esta figura se observa que los miembros afectados en ambas familias segregan con la enfermedad.

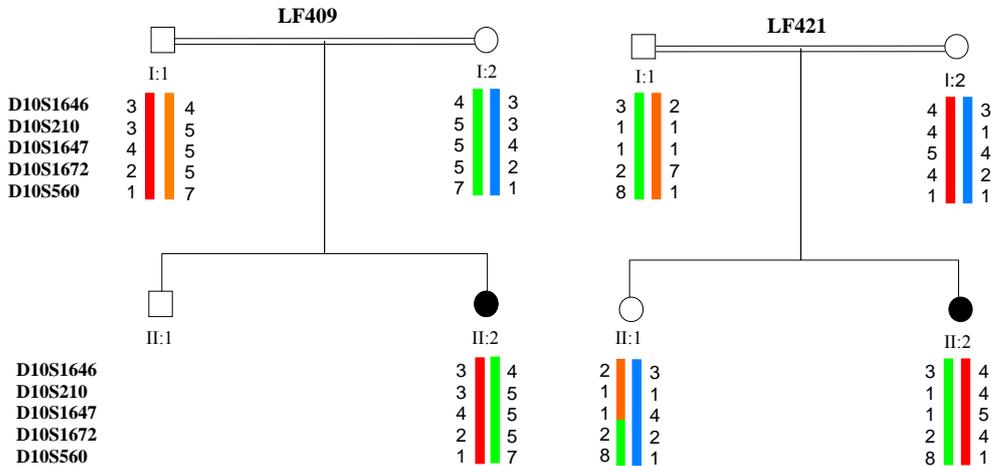


Figura 44.- Haplotipos de los casos esporádicos LF409 y LF421 con los marcadores ligados al locus HMSN-Russe. En esta figura se observa que los miembros afectados en ambas familias pueden segregar con la enfermedad.

Procedimos al análisis de ligamiento bipuntual entre los cinco marcadores microsatélites utilizados, en las familias LF42, LF302 y LF502, y en los casos esporádicos LF409, LF421 y VAL.9. En dos de las tres familias (LF42 y LF302) se obtuvieron valores *lod* positivos para todos los marcadores ligados al locus HMSN-Russe, mientras que en la familia LF502 y en dos de los tres casos esporádicos (LF409 y VAL.9) obtuvimos valores *lod* positivos para algunos de los marcadores ligados al locus CMT4G (tabla 24 y 25). No encontramos valores de *lod* positivos para ningún marcador en el caso esporádico LF421 e incluso en varios de ellos se pudo excluir ligamiento al obtenerse valores inferiores a -2.0 (tabla 25).

A pesar de obtener valores *lod* positivos para el locus CMT4G en las familias LF42, LF302 y LF502 y en los casos esporádicos LF409 y VAL.9, y debido a que el número de pacientes en las familias estudiadas no son muy numerosos como para obtener suficientes resultados para alcanzar la significación estadística, el resultado del análisis de ligamiento no nos permite confirmar ni

descartar ligamiento a dicho locus. Sin embargo, en la familia LF42 obtuvimos un máximo *lod score* para el marcador D10S1647 ($Z = 1.40$, $\theta = 0.00$) que aunque no permite confirmar ligamiento a dicho locus, sí que es un valor a tener en cuenta. En estudios previos (Rogers *et al.*, 2000) el máximo valor *lod* se obtuvo para este mismo marcador en una familia búlgara con fenotipo HMSN-Russe. Contrariamente, en el caso esporádico LF421 sí que excluimos ligamiento a este locus al no obtener valores *lod* (Z) positivos para ningún marcador y en varios de ellos se pudo excluir definitivamente ligamiento al locus HMSN-Russe al obtenerse valores menores de -2.0 .

Tabla 24.- Valores *lod* para los marcadores ligados al locus HMSN-Russe (10q23) en las familias LF42, LF302.

LF42

		<i>lod score (Z) para las fracciones de recombinación (θ)</i>						
Marcador	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	
D10S1646	0.66	0.64	0.57	0.47	0.31	0.17	0.06	
D10S210	0.75	0.73	0.65	0.55	0.36	0.20	0.08	
D10S1647	1.40	1.37	1.24	1.07	0.74	0.43	0.18	
D10S1672	0.69	0.67	0.59	0.50	0.32	0.18	0.07	
D10S560	0.50	0.49	0.43	0.36	0.23	0.12	0.05	

En rojo se refleja el máximo Lod Score obtenido para cada marcador.

LF302

		<i>lod score (Z) para las fracciones de recombinación (θ)</i>						
Marcador	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	
D10S1646	0.43	0.42	0.37	0.32	0.20	0.10	0.03	
D10S210	0.43	0.42	0.37	0.32	0.20	0.10	0.03	
D10S1647	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
D10S1672	0.43	0.42	0.37	0.32	0.20	0.10	0.03	
D10S560	0.43	0.42	0.37	0.32	0.20	0.10	0.03	

En rojo se refleja el máximo Lod Score obtenido para cada marcador.

Resultados

Tabla 25.- Valores lod para los marcadores ligados al locus HMSN-Russe (10q23) en la familia LF502 y en los casos esporádicos LF409, LF421 y VAL.9.

LF502 *lod score (Z) para las fracciones de recombinación (θ)*

Marcador	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
D10S1646	-0.00	-0.00	-0.00	-0.00	-0.00	-0.00	-0.00
D10S210	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D10S1647	0.00	0.00	-0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D10S1672	-0.00	-0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D10S560	$-\infty$						

En rojo se refleja el máximo Lod Score obtenido para cada marcador.

LF409 *lod score (Z) para las fracciones de recombinación (θ)*

Marcador	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
D10S1646	0.57	0.55	0.46	0.36	0.18	0.07	0.01
D10S210	0.48	0.46	0.38	0.29	0.15	0.06	0.01
D10S1647	0.46	0.44	0.35	0.26	0.11	0.03	-0.01
D10S1672	0.28	0.26	0.19	0.11	0.02	-0.02	-0.03
D10S560	-0.17	-0.18	-0.22	-0.23	-0.20	-0.14	-0.08

En rojo se refleja el máximo Lod Score obtenido para cada marcador.

LF421 *lod score (Z) para las fracciones de recombinación (θ)*

Marcador	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
D10S1646	-1.90	-1.19	-0.60	-0.35	-0.14	-0.05	-0.01
D10S210	-1.78	-1.07	-0.49	-0.26	-0.09	-0.03	-0.00
D10S1647	-1.88	-1.14	-0.56	-0.34	-0.16	-0.01	-0.05
D10S1672	-2.00	-1.28	-0.66	-0.39	-0.17	-0.07	-0.03
D10S560	-2.18	-1.10	-0.49	-0.27	-0.11	-0.06	-0.03

En rojo se refleja el máximo Lod Score obtenido para cada marcador.

VAL.9 *lod score (Z) para las fracciones de recombinación (θ)*

Marcador	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
D10S1646	-0.18	-0.17	-0.14	-0.10	-0.06	-0.02	-0.01
D10S210	-0.18	-0.17	-0.14	-0.10	-0.06	-0.02	-0.01
D10S1647	0.12	-0.12	-0.10	-0.08	-0.05	0.02	0.01
D10S1672	0.12	0.12	0.10	0.08	0.05	0.02	0.01
D10S560	-0.17	-0.18	-0.22	-0.23	-0.20	-0.14	-0.08

En rojo se refleja el máximo Lod Score obtenido para cada marcador.

Ante el resultado obtenido del análisis de ligamiento en las familias LF42, LF302, LF502 y en los casos esporádicos LF409 y VAL.9 en las que no pudimos confirmar ni descartar ligamiento al locus CMT4G; Si consideramos, por un lado que la información publicada en otros trabajos sobre el haplotipo asociado a la HMSN-Russe en familias gitanas de origen búlgaro, español y rumano en la que todos los cromosomas enfermos mostraron un haplotipo conservado para los marcadores microsatélites, cen-D10S1646-D10S210-D10S1647-D10S1672-D10S560-tel, siendo este **2-5-6-1-1**, sugiriendo que podría existir una única mutación fundacional ancestral causante de la enfermedad (Rogers *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2001), y por otro lado, que la población gitana constituye un grupo genéticamente distinto respecto a otras poblaciones europeas, bien por la diferencia étnica o influenciada por la elevada tasa de endogamia, cabría esperar que los pacientes presentaran al menos homocigosidad para los marcadores microsatélites ligados al locus HMSN-Russe. En este sentido, decidimos estudiar y comparar los datos obtenidos del análisis de haplotipos en las tres familias (LF42, LF302 y LF502) y los 6 casos esporádicos (LF347, LF378, LF409, LF444, LF476 y VAL.9) de nuestra serie de estudio (fig.45) con los obtenidos en trabajos anteriores (Rogers *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2001). Observamos que, únicamente las familias LF42 y LF502, y el caso esporádico LF444 mostraron homocigosidad alélica respecto al haplotipo conservado **2-5-6-1-1**, a excepción de los marcadores D10S1647 (en las familias LF42 y LF502) y D10S1672 (en las dos familias y el caso esporádico LF444). En los casos esporádicos LF409, LF378 y LF476 aunque se mantenía la homocigosidad alélica para todos los marcadores microsatélites utilizados, el haplotipo mostrado en cada uno de estos pacientes no representaba al haplotipo conservado descrito en estudios previos en familias gitanas procedentes de diferentes países de Europa (Rogers *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2001). En la familia LF302 y los casos esporádicos LF347 y VAL.9 no se mantuvo la homocigosidad alélica para los marcadores microsatélites ligados al locus HMSN-

Resultados

Russe, sugiriendo que los valores *lod* positivos obtenidos (LF302 y VAL.9) podrían ser fortuitos y por tanto no representarían ligamiento real a dicho locus.

Así, en base a la información de la que disponíamos y ante el resultado del análisis de haplotipos en nuestra serie de estudio podríamos descartar el locus HMSN-Russe en la familia LF302 y los casos esporádicos LF347, LF378, LF409, LF476 y VAL.9.

Familias	Cromosomas	D10S1646	D10S210	D10S1647	D10S1672	D10S560
LF42	A	2	5	5	2	1
	B	2	5	5	2	1
LF302	C	7	6	3	4	6
	D	6	1	1	1	1
LF502	E	2	5	4	2	1
	F	2	5	4	2	1
LF409	G	3	3	4	2	1
	H	3	3	4	2	1
VAL.9	I	3	1	4	5	1
	J	4	5	3	3	4
LF347	K	6	2	1	1	1
	L	4	2	6	1	7
LF378	M	3	3	3	3	1
	N	3	3	3	3	1
LF444	O	2	5	6	2	1
	P	2	5	6	2	1
LF476	Q	6	4	5	3	1
	R	3	4	5	3	1

Figura 45.- Haplotipos con los marcadores microsatélites ligados al locus HMSN-Russe. La figura muestra los haplotipos obtenidos para las 3 familias (LF42, LF302 y LF502) y los 6 casos esporádicos (LF347, LF378, LF409, LF444, LF476 y VAL.9), de etnia gitana. El área marcada en gris oscuro muestra los alelos obtenidos en las familias LF42 y LF502, y el caso esporádico LF444 que representan al haplotipo conservado descrito previamente en familias gitanas con fenotipo HMSN-Russe (Rogers et al., 2000; Thomas et al., 2001). Las variaciones alélicas observadas para los marcadores D10S1647 (LF42 y LF502) y D10S1672 (LF42, LF502 y LF444) quedan representadas por tonalidades de gris más claro.

En base a los resultados genéticos obtenidos en nuestra serie de estudio decidimos extender el haplotipo en las familias LF42, LF502 y el caso esporádico LF444 en los que si observamos una homogeneidad del haplotipo. Seleccionamos dos marcadores microsatélites adicionales, D10S2480 y D10S1678, localizados en la región de ~2.9 Mb (fig.39), que también habían sido utilizados en estudios previos (Rogers *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2001). Procedimos de igual modo al análisis de ligamiento bipuntual entre cada uno de los marcadores microsatélites en estas dos familias y posterior análisis de haplotipos, incluyendo en este el caso esporádico LF444. Obtuvimos valores *lod* positivos para ambos marcadores microsatélites en ambas familias. En la familia LF42 el valor *lod* (*Z*) fue 1.13 con una $\theta = 0.00$, y $Z = 0.16$ con una $\theta = 0.00$ para el marcador D10S2480 y D10S1678 respectivamente, mientras que en la familia LF502 se obtuvo el mismo valor *lod* para ambos marcadores, $Z = 0.00$ con una $\theta = 0.00$. El resultado del análisis de haplotipos muestra de nuevo que no hay pérdida de homocigosidad y además los pacientes de las dos familias y el caso esporádico presentan los mismos alelos que el haplotipo conservado anteriormente publicado para estos marcadores microsatélites, siendo este **2-5-1-2-6-1-1** (fig. 46) (Rogers *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2001).

Fam.	Cromosomas	D10S1646	D10S210	D10S2480	D10S1678	D10S1647	D10S1672	D10S560
LF42	A	2	5	1	2	5	2	1
	B	2	5	1	2	5	2	1
LF502	E	2	5	1	2	4	2	1
	F	2	5	1	2	4	2	1
LF444	O	2	5	1	2	6	2	1
	P	2	5	1	2	6	2	1

Figura 46.- Haplotipos con los marcadores microsatélites ligados al locus HMSN-Russe. La figura muestra los haplotipos obtenidos para las 2 familias (LF42, y LF502) y el caso esporádico LF444, de etnia gitana. En rojo se muestran los alelos obtenidos para cada uno de los marcadores microsatélites que representan al haplotipo conservado en familias con fenotipo HMSN-Russe (Rogers *et al.*, 2000 y Thomas *et al.*, 2001). En azul y verde se representan las variaciones alélicas obtenidas en las familias LF42 y LF502 respectivamente, para el marcador D10S1647 y en violeta, se representan las variaciones alélicas para el marcador D10S1672.

Resultados

Posteriormente, Hantke y colaboradores (2003) publicaron un estudio que permitió la exclusión de 22 genes candidatos y la realización de un mapa genético en base a 141 marcadores polimórficos. Mediante el genotipado de una extensa serie de pacientes pertenecientes a diferentes familias gitanas de origen búlgaro, español, francés y rumano, permitió reducir el tamaño de la región candidata del gen HMSN-Russe de un intervalo genético de ~0.8 Mb a 70 Kb. En esta región se encuentra el clon BAC AL596223. Este clon fue secuenciado completamente y contiene 5 genes (centromérico a telomérico): *vacuolar sorting protein (VPS26)*, *suppressor of var1, 3-like 1 (SUPV3L1)*, los mRNAs *FLJ31406* y *FLJ22671/FLJ37767* y *Hkl* (fig.45).

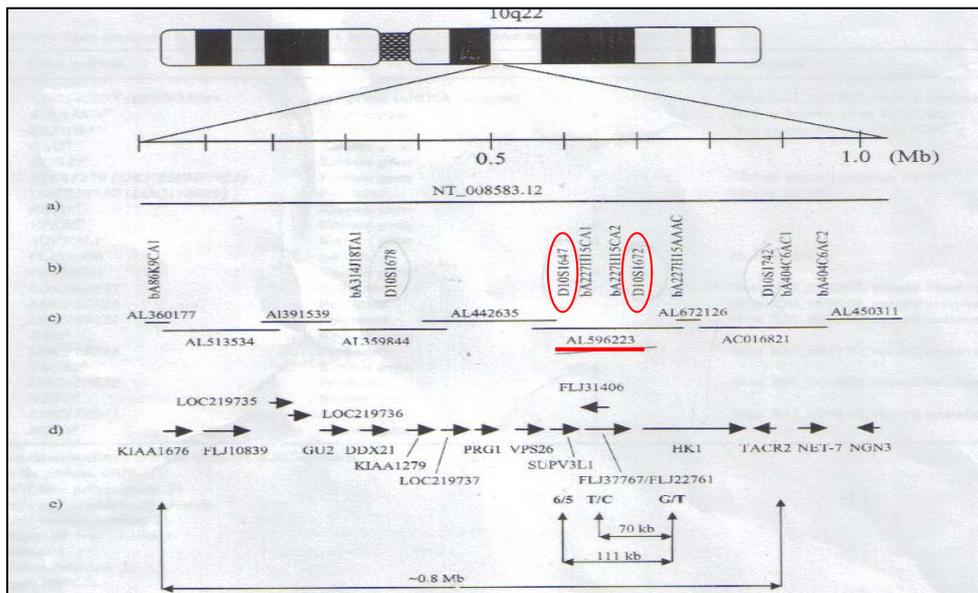


Figura 45.- Mapa integrado de la región crítica de la HMSN-Russe basado en el programa NCBI build 30; a) contig ,b) marcadores microsatélites (en un círculo de color rojo aparecen los marcadores D10S1647 y D10S1672),c) clones BAC de la región (subrayado en rojo está el clon BAC AL596223), d) genes localizados en esta región según el programa NCBI build 30 y UCSC correspondiente al mes de agosto 2002, e) localización previa de la región candidata de ~0.8 Mb y la reducción posterior de la región candidata a 111 Kb y 70 kb, respectivamente. Esta figura pertenece al trabajo realizado por Hantke y colaboradores (2003).

Con el fin de obtener más información en nuestras familias (LF42 y LF502) y el caso esporádico LF444 y debido a la variabilidad alélica mostrada por los pacientes de nuestra serie de estudio respecto a los marcadores microsatélites D10S1647 y D10S1672, decidimos ampliar el haplotipo seleccionando 7 SNPs (ver pág. 70 y 71 de material y métodos) localizados en la región del ARNm *FLJ22671/FLJ37767*, donde se localizan ambos marcadores microsatélites, y así reducir al máximo posibles eventos de recombinación o mutación. De los 7 SNPs seleccionados de las bases de datos UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.cse.ucsc.edu>) cuya heterocigosidad había sido rastreada en población general caucasiana, sólo el SNP rs874556 localizado a 48 kb y 31 kb de los marcadores D10S1647 y D10S1672, respectivamente, fue informativo. En los pacientes de las familias LF42 y LF502 observamos la presencia del alelo G (66%) cuya frecuencia alélica en la población general caucasiana se estima en el 41,5%, mientras que en el caso esporádico LF444 observamos la presencia del alelo A (33%) con una frecuencia alélica estimada en población general caucasiana del 58.5%. Cuando se analiza el haplotipo extendido, cen-D10S1646-D10S210-D10S2480-D10S1678-D10S1647-rs874556-D10S1672-D10S560-tel, se identifican 2 haplotipos diferentes:

Haplotipo A: 2-5-1-2-5/4-G-2-1 (LF42 y LF502) Haplotipo B: 2-5-1-2-6-A-2-1 (LF444)

Estos resultados, si aceptamos la hipótesis que el gen HMSN-Russe es el responsable de la enfermedad de CMT en estos pacientes, sugieren que podría existir más de una mutación que segregaría en estas familias. Por otro lado, este resultado nos indica que en las 6 familias y 7 casos esporádicos en los que se ha excluido la HMSN-Lom y HMSN-Russe que se dan sólo en familias de origen gitano, pueden existir otras formas de CMT que afectan a este grupo étnico.

4.3.2.- ESTUDIO DEL LOCUS CMT4C.

4.3.2.1.- Análisis genético mediante el estudio de ligamiento y de haplotipos al locus CMT4C en el cromosoma 5q23-q33.

El locus de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 4C (CMT4C) fue cartografiado originariamente en el cromosoma 5q23-q33 en pacientes argelinos diagnosticados de CMT desmielinizante y con un patrón de herencia autosómico recesivo (LeGuern *et al.*, 1996). Posteriormente, se describieron mediante análisis de ligamiento al locus CMT4C otras familias de origen alemán y turco (Gabreëls-Festen *et al.*, 1999; Guilbot *et al.*, 1999; Nelis *et al.*, 2001). Estudios posteriores (Senderek *et al.*, 2003c) con familias turcas y alemanas permitieron la reducción del intervalo genético del locus CMT4C a 1.7 Mb y la identificación del gen responsable de la enfermedad, *SH3TC2*. Clínica y electrofisiológicamente, la enfermedad de CMT tipo 4C se caracteriza por la aparición temprana de la enfermedad (1ª o 2ª década de vida), presentan debilidad muscular distal y atrofia, afectación de la musculatura proximal en la mayoría de casos y deformidad de los pies, velocidades de conducción motora y sensitiva reducidas (VCN motora media ~ 22.4 m/s) y la mayoría de casos descritos presentan la aparición temprana de escoliosis. La biopsia del nervio revela un incremento en la producción de la lámina basal así como también alteraciones en los procesos de formación de las células de Schwann (Senderek *et al.*, 2003c).

En nuestra serie inicial de 8 familias y 9 casos esporádicos, de etnia gitana y diagnosticadas con la enfermedad de CMT desmielinizante y con un patrón de herencia autosómico recesivo, excluimos los loci HMSN-Lom y la HMSN-Russe en 6 familias (LF2, LF13, LF235/LF402, LF302, VAL.15 y VAL.21) y 7 casos esporádicos (LF347, LF378, LF409, LF421, LF454, LF476 y VAL.9) como responsables de la enfermedad de CMT en estos pacientes.

Los informes clínicos completos de los probandos de las familias y casos esporádicos en los que se habían descartado las neuropatías HMSN-Lom y HMSN-Russe, fueron supervisados por el Servicio de Neurología del Hospital Universitario La Fe de Valencia, sugiriendo que la mayoría de ellos presentaban un fenotipo similar al descrito para la forma CMT4C en población caucasiana. Las características clínicas, electrofisiológicas y, en ocasiones, anatomopatológicas de la serie procedente del Hospital Universitario La Fe de Valencia, excepto las familias VAL.15, VAL.21 y el caso esporádico VAL.9 que proceden de otros Centros Sanitarios, presentaron una aparición temprana de la enfermedad con retraso en el desarrollo motor y dificultad para caminar, frecuentes caídas, deformidad en los pies, escoliosis, atrofia muscular distal y ataxia sensitiva. La progresión de la enfermedad en la mayoría de nuestros pacientes es muy agresiva, con parálisis y atrofia que afecta a la musculatura proximal, produciendo incluso la muerte en la 3ª década de vida. Las velocidades de conducción motora son intermedias (~20-35 m/s) y la biopsia del nervio sural muestra la pérdida de fibras mielinizadas, pequeñas formaciones en bulbo de cebolla debidas a una proliferación de la lámina basal (Datos presentados por el Dr. Vilchez en *125th ENMC internacional Workshop: Neuromuscular Disorders in the Roma (Gypsy) Population, 2004*).

Seguidamente, habiendo descartado mediante el análisis genético los loci descritos en población gitana asociados con la enfermedad de CMT (HMSN-Lom y HMSN-Russe) y en base al fenotipo clínico descrito en los pacientes de nuestra serie de estudio, decidimos realizar el estudio genético del locus CMT4C mediante el análisis de ligamiento y segregación de haplotipos en las 6 familias y 7 casos esporádicos. También incluimos en este estudio a las familias LF42, LF502 y el caso esporádico LF444, ya que los resultados obtenidos para el estudio de ligamiento o de haplotipos del locus HMSN-Russe no son del todo concluyentes, dado además que no está identificado el gen responsable.

Resultados

En las familias (LF2, LF13, LF42, LF235/LF402, LF302, LF502, VAL.15 y VAL.21) y 4 de los 8 casos esporádicos (LF409, LF421, LF454 y VAL.9), con un total de 24 pacientes, se procedió a realizar el análisis de ligamiento bipuntual entre los marcadores microsatélites (D5S658, D5S1480, D5S413, D5S2015, D5S636 y D5S820) y el locus CMT4C, empleando el programa MLINK 5.1 del paquete FASTLINK 2.1. Al mismo tiempo construimos los haplotipos para esos 6 marcadores microsatélites y el SNP intrónico c.IVS14+69C/T, ligados al locus CMT4C que abarcan una región de ~17.6 Mb (fig.47), con el fin de estudiar la segregación, y en el que incluimos a los 4 casos esporádicos restantes (LF347, LF378, LF444 y LF476) en los que sólo disponíamos del caso probando y no de datos familiares para seguir la información genética entre generaciones. El SNP c.IVS14+69C/T, localizado en el intrón 14 del gen *SH3TC2*, fue seleccionado tras ser rastreado en población general española obteniéndose una frecuencia alélica para el alelo C del 58% frente al 42% para el alelo T.

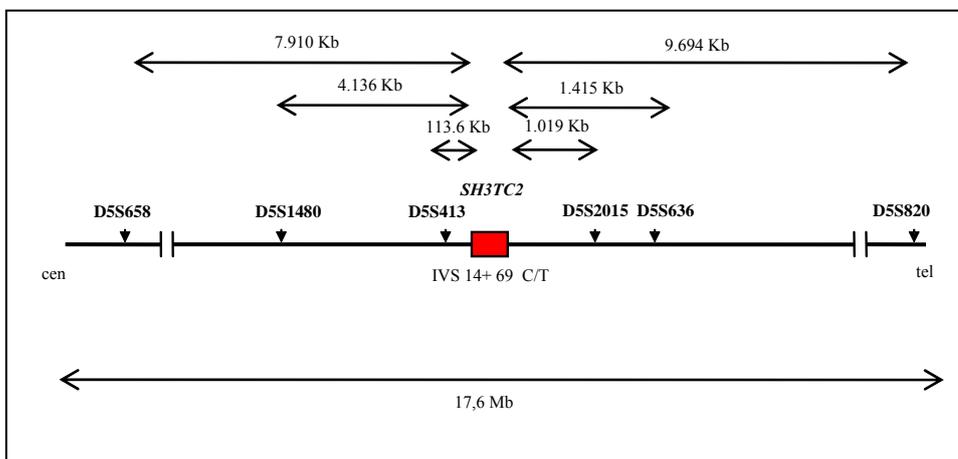


Figura 47.- Mapa físico del locus CMT4C. La caja roja representa al gen *SH3TC2* situado en el centro de la figura. La posición de los seis marcadores microsatélites ligados, está indicada con una punta de flecha negra. Las flechas \leftrightarrow indican las distancias físicas de cada marcador respecto al gen *SH3TC2*. El SNP IVS14+69C/T (intrónico) aparece ubicado debajo del gen *SH3TC2*.

Tras la construcción del haplotipo, cen-D5S658-D5S1480-D5S413-c.IVS14+69C/T-D5S2015-D5S636-D5S820-tel, en las 8 familias y 4 de los 8 casos esporádicos observamos que todos segregaban con el locus CMT4C a excepción de las familias LF42 y VAL.15, por lo que finalmente fueron excluidas para el locus CMT4C (fig.48, fig.49, fig.50, fig.51, fig.52 y fig.53).

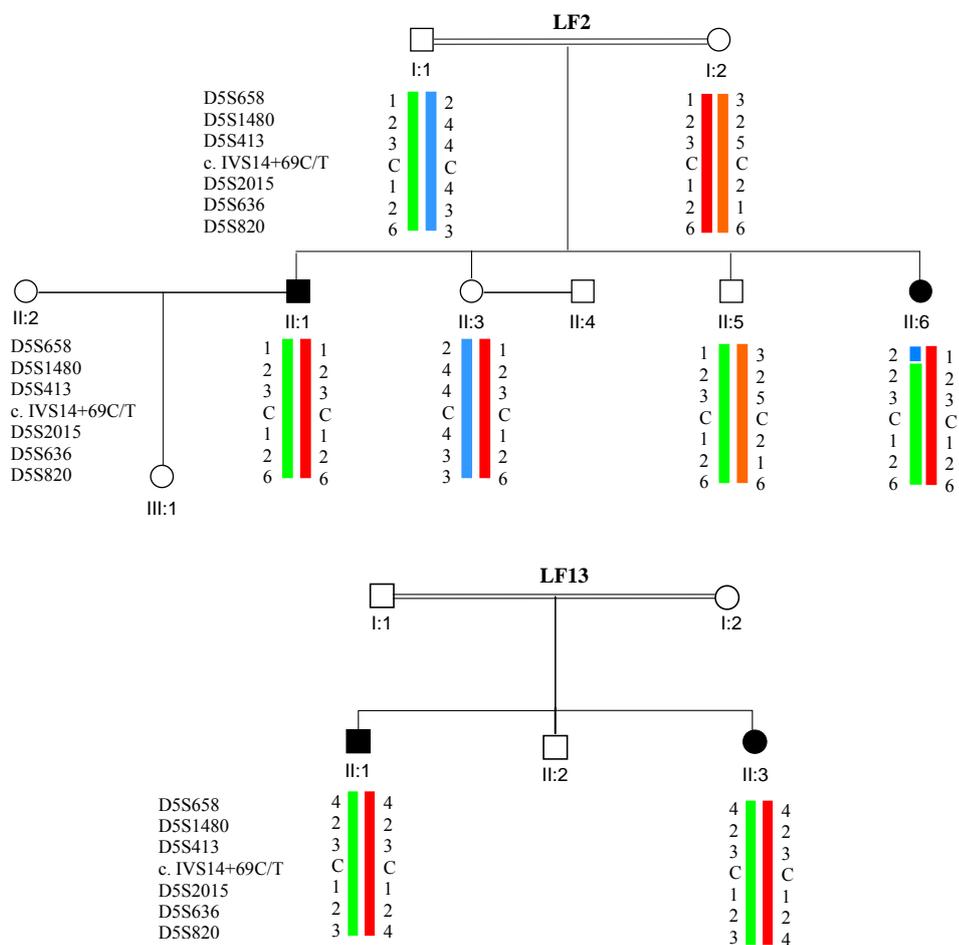


Figura 48.- Haplotipos de las familias LF2 y LF13 con los marcadores ligados al locus CMT4C. En esta figura se observa que los pacientes enfermos en ambas familias comparten el mismo haplotipo; únicamente observamos variabilidad alélica para el marcador más distal, D5S658, y más proximal, D5S820, respecto del gen SH3TC2.

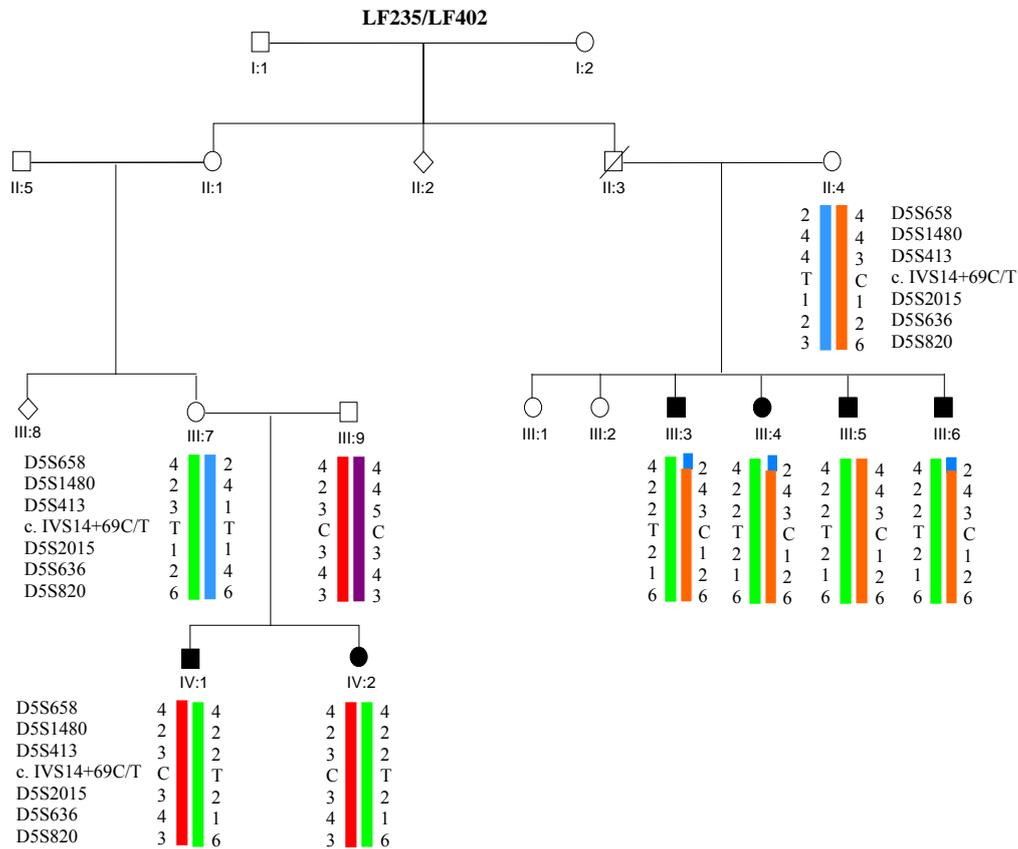


Figura 49.- Haplotipo de la familia LF235/LF402 con los marcadores ligados al locus CMT4C. En esta figura se observa que los pacientes enfermos comparten el mismo haplotipo. El cromosoma pintado de color verde es idéntico en ambas ramas de esta familia, mientras que el otro cromosoma pintado de color naranja o de color rojo, únicamente comparten los alelos referentes al marcador D5S413, localizado a 113,6 Kb respecto del gen SH3TC2, y al SNP intrónico c.IVS14+69C/T.

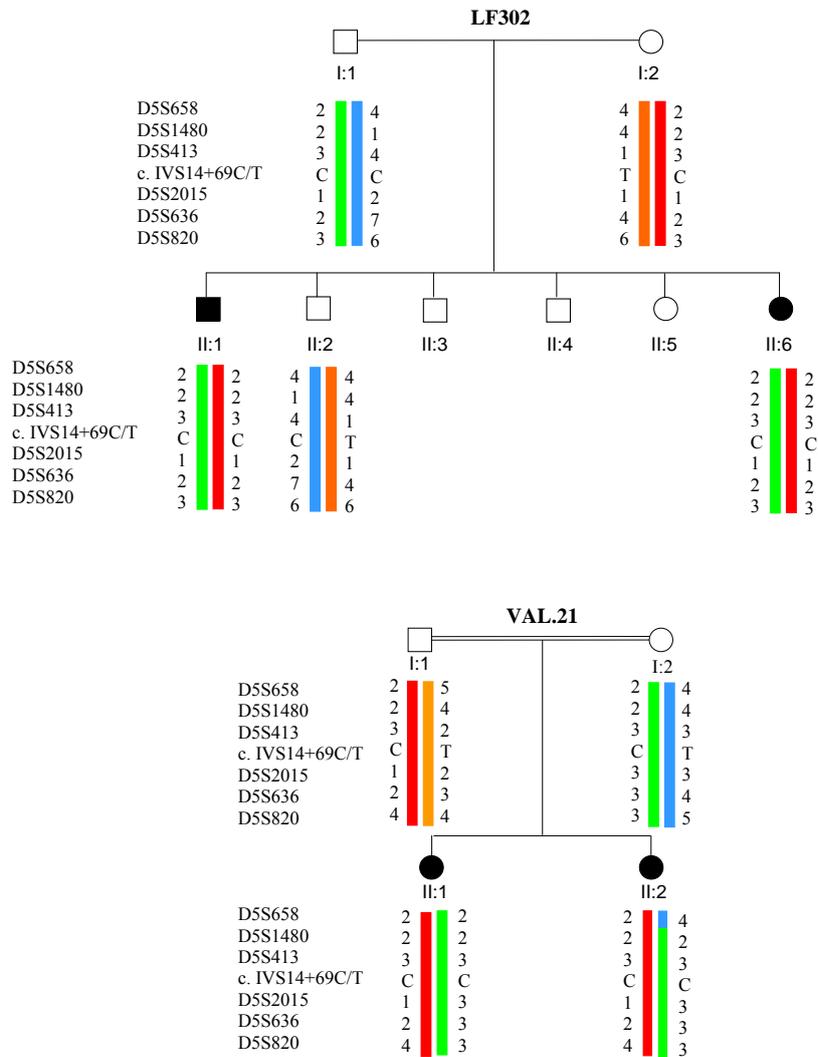


Figura 50.- Haplotipos de las familias LF302 y VAL.21 con los marcadores ligados al locus CMT4C. En esta figura se observa que los pacientes enfermos de ambas familias comparten el mismo haplotipo.

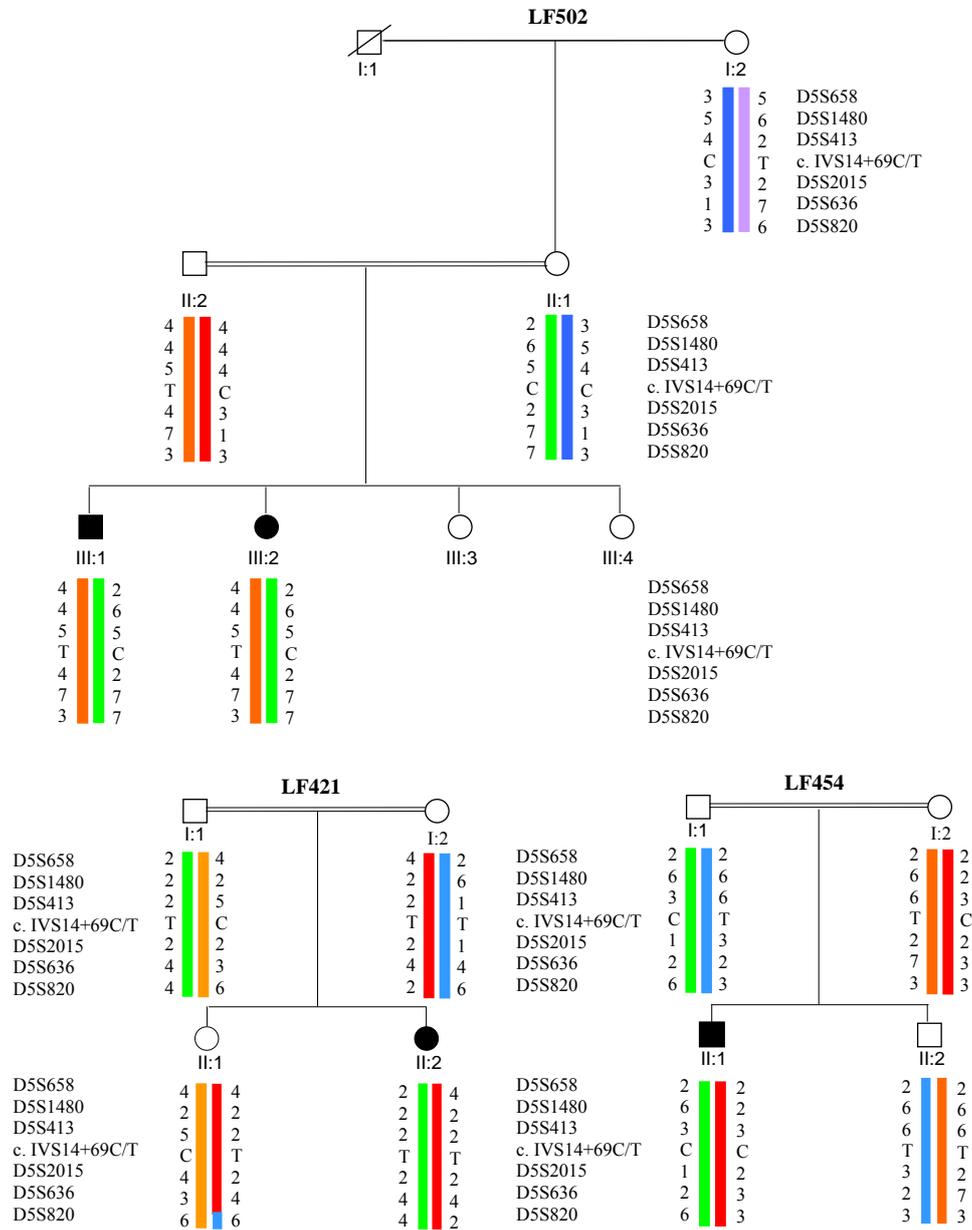


Figura 51.- Haplotipos de la familia LF502 y los casos esporádicos LF421 y LF454 con los marcadores ligados al locus CMT4C. En esta figura se observa que los pacientes enfermos, tanto en el caso familiar como en los esporádicos segregan con el locus CMT4C.

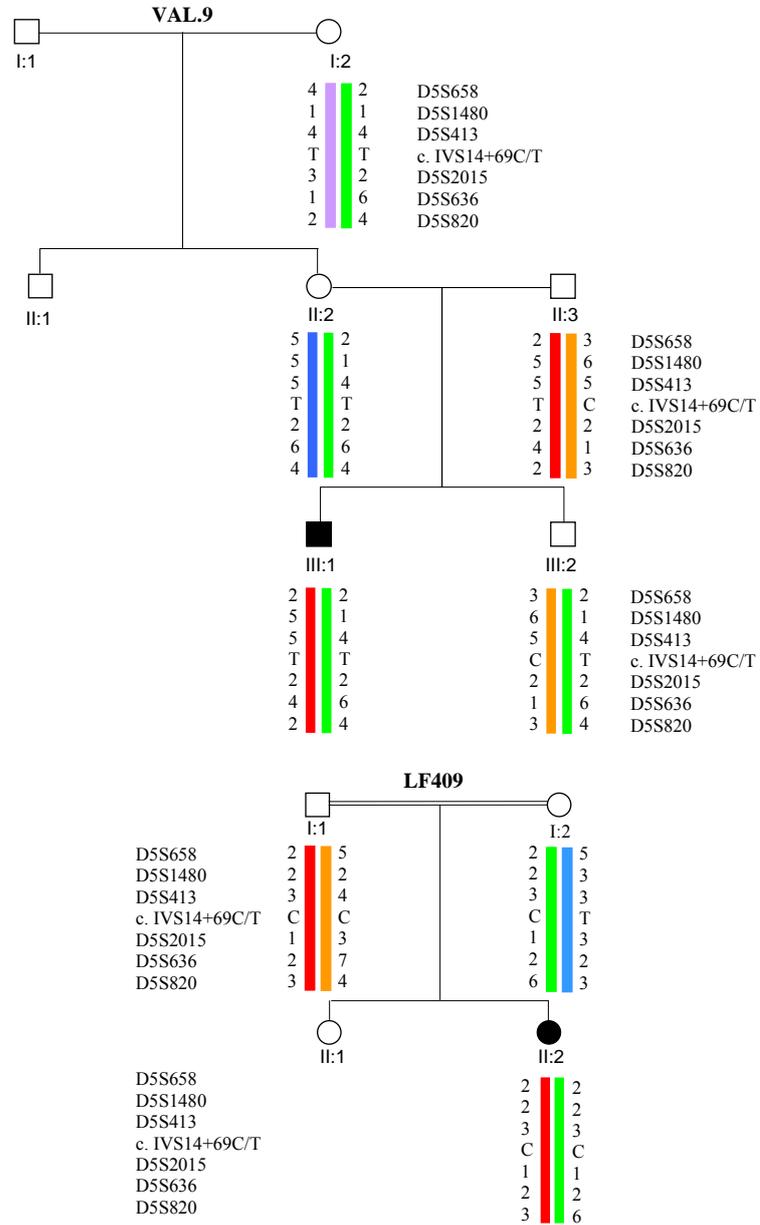


Figura 52.- Haplotipos los casos esporádicos VAL.9 y LF409 con los marcadores ligados al locus CMT4C. En esta figura se observa que los pacientes enfermos segregan con el locus CMT4C.

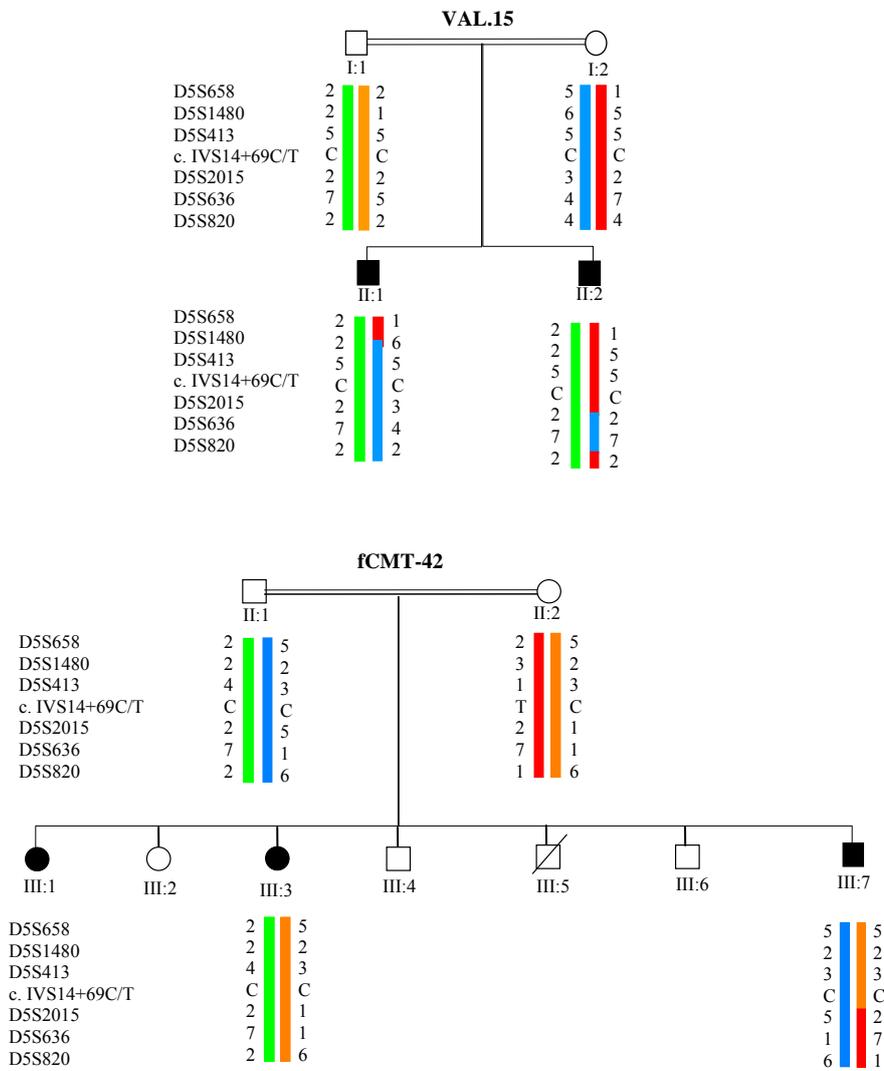


Figura 52.- Haplotipos de las familias LF42 y VAL.15 con los marcadores ligados al locus CMT4C. En esta figura se observa que los miembros enfermos en estas familias no comparten el mismo haplotipo.

A continuación, realizamos el análisis de ligamiento bipuntual entre cada uno de los 6 marcadores utilizados, en las seis familias (LF2, LF13, LF235/LF402, LF302, LF502 y VAL.21) y cuatro casos esporádicos (LF409, LF421, LF454 y VAL.9). En las familias LF2, LF235/LF402, LF13 y los casos esporádicos LF409 y LF421 obtuvimos valores *lod* positivos para todos los marcadores analizados, a excepción del marcador D5S658, distal respecto del gen *SH3TC2*, y D5S820 (LF13, LF409 y LF421), proximal respecto del gen *SH3TC2*, en los que se excluyó ligamiento tras obtenerse valores *lod* inferiores a -2.0 (Tabla 26 y Tabla 27).

Tabla 26.- Valores *lod* para los marcadores ligados al locus CMT4C en las familias LF2 y LF235/LF402.

LF2

lod score (Z) para las fracciones de recombinación (θ)

Marcador	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
D5S658	$-\infty$	-0.38	-0.34	-0.13	-0.00	0.02	0.01
D5S1480	0.91	0.88	0.80	0.69	0.47	0.27	0.12
D5S413	1.65	1.61	1.45	1.24	0.84	0.47	0.19
D5S2015	1.65	1.61	1.45	1.24	0.84	0.47	0.19
D5S636	1.65	1.61	1.45	1.24	0.84	0.47	0.19
D5S820	0.91	0.88	0.80	0.69	0.47	0.27	0.12

En rojo se refleja el máximo Lod Score obtenido para cada marcador.

LF235/LF402

lod score (Z) para las fracciones de recombinación (θ)

Marcador	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
D5S658	$-\infty$	0.17	0.68	0.74	0.58	0.34	0.12
D5S1480	1.81	1.77	1.59	1.37	0.93	0.52	0.19
D5S413	2.71	2.65	2.40	2.09	1.44	0.82	0.29
D5S2015	1.92	1.87	1.66	1.41	0.89	0.44	0.11
D5S636	2.12	2.07	1.86	1.60	1.07	0.58	0.20
D5S820	1.88	1.84	1.66	1.43	0.97	0.52	0.15

En rojo se refleja el máximo Lod Score obtenido para cada marcador.

Resultados

Tabla 27.- Valores *lod* para los marcadores ligados al locus CMT4C en la familia LF13 y los casos esporádicos LF409 y LF421.

LF13

lod score (Z) para las fracciones de recombinación (θ)

Marcador	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
D5S658	1.21	1.18	1.06	0.91	0.61	0.34	0.13
D5S1480	1.21	1.18	1.06	0.91	0.61	0.34	0.13
D5S413	1.21	1.18	1.06	0.91	0.61	0.34	0.13
D5S2015	1.21	1.18	1.06	0.91	0.61	0.34	0.13
D5S636	1.21	1.18	1.06	0.91	0.61	0.34	0.13
D5S820	-1.46	-0.80	-0.26	-0.07	0.02	0.02	-0.00

En rojo se refleja el máximo Lod Score obtenido para cada marcador.

LF409

lod score (Z) para las fracciones de recombinación (θ)

Marcador	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
D5S658	0.66	0.63	0.54	0.43	0.24	0.10	0.02
D5S1480	0.66	0.64	0.56	0.47	0.29	0.16	0.06
D5S413	0.66	0.64	0.56	0.47	0.29	0.16	0.06
D5S2015	0.66	0.63	0.54	0.43	0.24	0.10	0.02
D5S636	0.66	0.64	0.56	0.47	0.29	0.16	0.06
D5S820	-2.12	-1.00	-0.40	-0.19	-0.04	-0.01	-0.00

En rojo se refleja el máximo Lod Score obtenido para cada marcador.

LF421

lod score (Z) para las fracciones de recombinación (θ)

Marcador	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
D5S658	$-\infty$	-0.38	-0.34	-0.13	-0.00	0.02	0.01
D5S1480	0.91	0.88	0.80	0.69	0.47	0.27	0.12
D5S413	1.65	1.61	1.45	1.24	0.84	0.47	0.19
D5S2015	1.65	1.61	1.45	1.24	0.84	0.47	0.19
D5S636	1.65	1.61	1.45	1.24	0.84	0.47	0.19
D5S820	-1.73	-1.22	-0.68	-0.44	-0.23	-0.14	-0.08

En rojo se refleja el máximo Lod Score obtenido para cada marcador.

En la familia LF302 se obtuvieron valores *lod* positivos para todos los marcadores (Tabla 28). En el caso de la familia VAL.21 obtuvimos valores *lod* positivos para los marcadores D5S1480 y D5S413, mientras que para el resto de marcadores utilizados nos permitían excluir ligamiento tras obtenerse valores *lod*

inferiores a -2.0 (Tabla 28). En el caso esporádico LF454 obtuvimos valores *lod* positivos para los marcadores D5S658 y D5S413 mientras que para el resto de marcadores se obtuvieron valores *lod* inferiores a -2.0 excluyendo ligamiento (Tabla 29). Obtuvimos valores *lod* positivos para todos los marcadores a excepción del marcador D5S413 en el caso esporádico VAL.9, resultando el mismo valor *lod* para los cinco marcadores microsatélites utilizados (Tabla 29). Finalmente, en la familia LF502 obtuvimos el mismo valor *lod* para todos los marcadores (Tabla 29).

Tabla 28.- Valores *lod* para los marcadores ligados al locus CMT4C en la familia LF302 y el caso esporádico VAL.21.

LF302

lod score (Z) para las fracciones de recombinación (θ)

Marcador	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
D5S658	0.73	0.71	0.64	0.55	0.37	0.19	0.05
D5S1480	0.73	0.71	0.64	0.55	0.37	0.19	0.05
D5S413	0.73	0.71	0.64	0.55	0.37	0.19	0.05
D5S2015	0.43	0.42	0.37	0.32	0.20	0.10	0.03
D5S636	0.73	0.71	0.64	0.55	0.37	0.19	0.05
D5S820	0.73	0.71	0.64	0.55	0.37	0.19	0.05

En rojo se refleja el máximo Lod Score obtenido para cada marcador.

VAL.21

lod score (Z) para las fracciones de recombinación (θ)

Marcador	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
D5S658	-∞	-0.62	-0.03	0.14	0.19	0.14	0.07
D5S1480	1.26	1.23	1.09	0.93	0.60	0.30	0.08
D5S413	0.96	0.93	0.84	0.72	0.49	0.28	0.12
D5S2015	-1.60	-0.90	-0.34	-0.13	-0.00	0.02	0.01
D5S636	-1.52	-0.82	-0.26	-0.06	0.05	0.04	0.01
D5S820	-∞	-∞	-∞	-∞	-∞	-∞	-∞

En rojo se refleja el máximo Lod Score obtenido para cada marcador.

Resultados

Tabla 29.- Valores *lod* para los marcadores ligados al locus CMT4C en la familia LF502 y los casos esporádicos LF454 y VAL.9.

LF502

lod score (Z) para las fracciones de recombinación (θ)

Marcador	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
D5S658	-0.00	-0.00	-0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D5S1480	-0.00	0.00	-0.00	-0.00	0.00	0.00	0.00
D5S413	0.00	0.00	-0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D5S2015	0.00	0.00	-0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D5S636	-0.00	-0.00	-0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D5S820	-0.00	-0.00	-0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

En rojo se refleja el máximo Lod Score obtenido para cada marcador.

LF454

lod score (Z) para las fracciones de recombinación (θ)

Marcador	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
D5S658	0.46	0.45	0.39	0.31	0.18	0.08	0.02
D5S1480	-1.88	-1.14	-0.56	-0.34	-0.16	-0.10	-0.05
D5S413	0.78	0.76	0.66	0.54	0.32	0.15	0.04
D5S2015	-1.78	-1.07	-0.49	-0.26	-0.09	-0.03	-0.00
D5S636	-1.78	-1.07	-0.49	-0.26	-0.09	-0.03	-0.00
D5S820	-1.88	-1.14	-0.56	-0.34	-0.16	-0.10	-0.05

En rojo se refleja el máximo Lod Score obtenido para cada marcador.

VAL.9

lod score (Z) para las fracciones de recombinación (θ)

Marcador	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
D5S658	0.12	0.12	0.10	0.08	0.05	0.02	0.01
D5S1480	0.12	0.12	0.09	0.06	0.02	0.00	0.00
D5S413	-0.18	-0.17	-0.14	-0.10	-0.06	-0.02	-0.01
D5S2015	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D5S636	0.12	0.12	0.10	0.08	0.05	0.02	0.01
D5S820	0.12	0.12	0.10	0.08	0.05	0.02	0.01

En rojo se refleja el máximo Lod Score obtenido para cada marcador.

Considerando estos resultados individualmente podríamos sugerir ligamiento al locus CMT4C únicamente en la familia LF235/LF402 tras obtenerse un máximo *lod score* para el marcador D5S413 de $Z = 2.71$ para una $\theta = 0.0$, aunque este valor no confirma ligamiento definitivo a este locus. Sin embargo, para

el resto de familias y casos esporádicos aún teniendo valores *lod* positivos no podíamos confirmar ni descartar que hubiera ligamiento a dicho locus.

Tras al resultado obtenido del análisis de ligamiento en estas 6 familias y 4 casos esporádicos procedimos al análisis de segregación del haplotipo, incluyendo los cuatro casos esporádicos LF347, LF378, LF444 y LF476 en los que no pudimos realizar el análisis de ligamiento al disponer únicamente del caso probando, en base a los marcadores cen-D5S658-D5S1480-D5S413-c.IVS14+69C/T-D5S2015-D5S636-D5S820-tel (fig.47). A excepción de los marcadores microsatélites D5S658 y D5S820, más distal y proximal respecto del gen *SH3TC2*, en los que encontramos una elevada variabilidad alélica entre cada una de las familias y casos esporádicos o incluso entre pacientes de una misma familia, observamos que para el resto de marcadores se mantenía la homocigosidad alélica con respecto a un haplotipo común mayoritario observado en nuestra serie de estudio con algunas variantes en las familias LF235/LF402 y VAL.21, y los casos esporádicos LF347, LF421, y LF454, que o bien presentaban haplotipos diferentes o variaciones alélicas para los marcadores D5S1480, D5S2015 y D5S636. En el caso esporádico LF444, a pesar de que mantiene la homocigosidad alélica el haplotipo obtenido no se asemeja al haplotipo común mayoritario obtenido en nuestra serie de estudio. Por otro lado, no se mantuvo la homocigosidad alélica en la familia LF502 ni en el caso esporádico VAL.9, obteniéndose para ambos casos haplotipos totalmente diferentes (fig.54). Por tanto, si analizamos el haplotipo en base a los marcadores cen-D5S1480-D5S413-c.IVS14+69C/T-D5S2015-D5S636-tel se pueden distinguir once haplotipos diferentes, I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI:

HAPLOTIPOS	D5S1480-D5S413-C.IVS14+69C/T-D5S2015-D5S636
I	2-3-C-1-2
II	4/6-3-C-1-2
III	2-3-C-3-4/3
IV	2-3-C-2-3
V	4-3-C-2-3
VI	2-2-T-2-1/4

Resultados

HAPLOTIPOS	D5S1480-D5S413-C.IVS14+69C/T-D5S2015-D5S636
VII	4-4-T-1-7
VIII	4-5-T-4-7
IX	6-5-T-2-7
X	5-5-T-2-4
XI	1-4-T-2-6

Teniendo en cuenta por un lado, que los pacientes de nuestra serie de estudio presentaban un fenotipo bastante homogéneo, y que sólo disponíamos de 1 ó 2 generaciones del árbol genealógico de cada una de las familias y casos esporádicos para el análisis de ligamiento, y que el análisis de segregación de haplotipos mostraba la existencia de un haplotipo común mayoritario en nuestra serie de estudio, consideramos interpretar los resultados del análisis de ligamiento globalmente (realizando el sumatorio de los valores *lod* obtenidos para cada marcador). En este caso sí que indicaría ligamiento a dicho locus del conjunto de familias, obteniéndose un máximo *lod score* para el marcador D5S413 que resulta en $Z = 9.63$, $\theta = 0.0$ (Tabla 30), al igual que se obtuvo en estudios previos (Senderek *et al.*, 2003). Para el valor sumatorio de *lod score* excluimos los datos obtenidos para la familia LF502 y el caso esporádico VAL.9 al obtenerse valores negativos.

Tabla 30.- Sumatorio de los valores *lod* para los marcadores ligados al locus CMT4C de las familias y casos esporádicos excluidos para los loci HMSN-Lom y HMSN-Russe.

Marcador	<i>lod score (Z) para las fracciones de recombinación (θ)</i>						
	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
D5S658	$-\infty$	1.11	2.19	2.61	1.96	1.10	0.39
D5S1480	3.26	3.86	3.93	3.51	2.42	1.32	0.53
D5S413	9.63	7.81	7.00	5.98	3.98	2.18	0.78
D5S2015	4.36	4.91	4.84	4.27	2.85	1.53	0.54
D5S636	4.71	5.26	5.19	4.61	3.17	1.75	0.65
D5S820	-1.55	0.27	1.60	1.82	1.44	0.76	0.19

En rojo se refleja el máximo valor lod obtenido para cada marcador.

Familias	Cromosomas	D5S658	D5S1480	D5S413	c.IVS14+69C/T	D5S2015	D5S636	D5S820
LF2	A	1/2	2	3	C	1	2	6
	B	1	2	3	C	1	2	6
LF13	C	4	2	3	C	1	2	3
	D	4	2	3	C	1	2	3/4
LF235/LF402	E	4	2	2	T	2	1	6
	F	2/4	4	3	C	1	2	6
LF302	G	4	2	3	C	3	4	3
	H	2	2	3	C	1	2	3
VAL.21	I	2	2	3	C	1	2	3
	J	2	2	3	C	1	2	4
LF409	K	2/4	2	3	C	3	3	3
	L	2	2	3	C	1	2	3
LF421	M	2	2	3	C	1	2	3
	N	2	2	2	T	2	4	4
LF454	O	4	2	2	T	2	4	2
	P	2	6	3	C	1	2	6
LF347	Q	2	2	3	C	2	3	3
	R	4	2	3	C	1	3	3
LF378	S	5	4	3	C	2	3	3
	T	2	2	3	C	1	2	4
LF476	U	2	2	3	C	1	2	4
	V	2	2	3	C	1	2	3
LF502	W	2	2	3	C	1	2	3
	X	4	4	5	T	4	7	3
LF444	Y	2	6	5	T	2	7	7
	Z	4	4	4	T	1	7	6
VAL.9	A1	4	4	4	T	1	7	6
	A2	2	5	5	T	2	4	2
	A3	2	1	4	T	2	6	4

Figura 54.- Haplotipos con los marcadores ligados al locus CMT4C. La figura muestra los haplotipos obtenidos para las 6 familias (LF2, LF13, LF235/LF402, LF302, LF502 y VAL.21) y los 8 casos esporádicos (LF409, LF421, LF454, LF347, LF378, LF444, LF476 y VAL.9) de etnia gitana. En gris se muestra la homocigosidad alélica observada en los diferentes cromosomas estudiados que representan al haplotipo común mayoritario. Los haplotipos diferentes respecto al haplotipo común se muestran en diferentes colores.

El haplotipo I, mayoritario en nuestra serie, fue observado en 13 de los 29 cromosomas estudiados (A, B, C, D, H, I, J, L, M, T, U, V y W), los haplotipos II, III, IV y V representados en 7 cromosomas (F, G, K, P, Q, R y S) presentaron variaciones alélicas para alguno de los marcadores microsátélites (D5S1480, D5S2015, D5S636) con respecto al haplotipo común, compartiendo sin embargo los mismos alelos para el marcador D5S413 y el SNP intrónico c.IVS14+69C/T, cercanos al locus CMT4C. Cabe plantear, pues, que los haplotipos II, III, IV y V fueran el resultado de recombinaciones ancestrales del haplotipo I, o que, realmente, fueran haplotipos no relacionados entre sí. Los haplotipos VI y VII representados también en tres (E, N y O) y dos cromosomas (Z y A1), respectivamente, junto con los otros haplotipos VIII, IX, X, XI representados en un cromosoma (X; Y; A2; A3), mostraron ser totalmente diferentes entre ellos. El conjunto del análisis sugería la posibilidad de la existencia de diferentes mutaciones responsables de la enfermedad de CMT en estos pacientes, o bien no se asociaban con mutaciones patológicas, siendo otra la causa genética de la neuropatía.

Sin embargo, con la excepción de la fenilcetonuria, las enfermedades mendelianas en la población gitana se han descrito como genéticamente homogéneas con una única mutación responsable y con haplotipos prácticamente idénticos causadas en su mayoría por mutaciones fundacionales (Kalaydjieva *et al.*,2001); Por ello, interpretamos los resultados planteando que la presencia de un haplotipo común mayoritario en nuestra serie de estudio sugiere que podría existir un haplotipo ancestral común sugiriendo la existencia de una probable mutación fundacional, y que la diversidad de haplotipos existente en 7 cromosomas podría deberse a fenómenos históricos de recombinación o a mutaciones de los marcadores microsátélites, fenómenos genéticos que han podido ocurrir en el tiempo.

4.3.2.2.- Análisis de mutaciones en el gen *SH3TC2*.

El gen *SH3TC2* fue cartografiado en el cromosoma 5q32 que es la misma región donde se localiza el locus CMT4C. Su estructura genómica se expande ~62 Kb y consta de ≥ 18 exones debido a la existencia de varios sitios de *splicing* alternativo (fig.55). El transcrito de mayor tamaño postulado presenta una ORF (*open reading frame*) de 3867 pb que codifica una proteína de 1288 aa (Senderek *et al.*, 2003c).

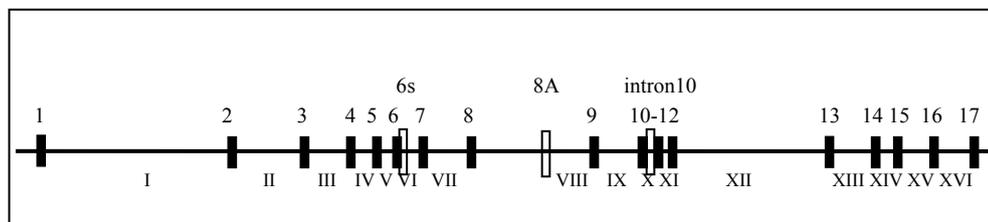


Figura 55.- Estructura genómica del gen *SH3TC2*. Los exones se indican con una barra de color negro numerados del 1 al 17 y las secuencias de *splicing* alternativo se indican con una barra de color blanco (6s, 8A e intron10), que dan lugar a productos proteicos de menor tamaño. Los 16 intrones que forman el gen *SH3TC2* están indicados con números romanos.

Nos planteamos la búsqueda de mutaciones en el gen *SH3TC2* en los pacientes probando de las 6 familias (LF2, LF13, LF235/LF402, LF302, LF502 y VAL.21) y 8 casos esporádicos (LF347, LF378, LF409, LF421, LF444, LF454, LF476 y VAL.9) que por el resultado del análisis de ligamiento y/o haplotipos parecían estar ligados al locus CMT4C. Para ello, realizamos la amplificación a partir de ADN genómico y posterior secuenciación por ambos extremos de los 17 exones y sus secuencias intrónicas flanqueantes, utilizando cebadores específicos que habían sido diseñados a partir de la secuencia del gen (contig genómico, NT_006859; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) y aparecen publicados “online” en el estudio realizado por Senderek y colaboradores (2003c).

Resultados

Detectamos la presencia de dos mutaciones distintas, una sustitución de un nucleótido por otro y la delección de tres nucleótidos. La sustitución es una transición c.3325C>T en el exón 14 que produce una mutación sin sentido, p.R1109X, dando lugar a un codón de parada prematuro cuya consecuencia posible es una proteína truncada. La segunda mutación es una delección de tres nucleótidos CCC, c.2211-2213delCCC, en el exón 11 que produce una mutación que altera la pauta de lectura, implicando a dos aminoácidos de la proteína salvaje y terminando la proteína en este mismo codón 738 (p.C737_P738delinsX). Los probandos de las familias LF2 (II:1), LF13 (II:1), LF302 (II:1) y VAL.21 (II:2) resultaron ser homocigotos para la mutación p.R1109X, mientras que el probando de la familia LF 235/LF402 (III:4), es heterocigoto compuesto para las mutaciones p.R1109X y p.C737_P738delinsX (figuras 56, 57, 58, 59, 60a y 60b). El análisis de mutaciones del gen *SH3TC2* en 5 de los 8 casos esporádicos, LF347, LF378, LF409, LF454 y LF476, demostró la presencia en homocigosis de la mutación p.R119X (fig.61 y fig.62). La familia LF502 y los casos esporádicos LF421, LF444 y VAL.9 resultaron negativas para el análisis de mutaciones en los 17 exones del gen *SH3TC2*.

Posteriormente, se analizó a todos los pacientes de las seis familias y se confirmó en cada genealogía la segregación mendeliana de las distintas mutaciones con la enfermedad. El análisis de la mutación p.C737_P738delinsX y la mutación p.R1109X en los padres se realizó mediante secuenciación directa del producto de PCR purificado correspondiente al exón 11 y al exón 14 respectivamente, mostrando que estos eran heterocigotos para ellas. Con el fin de determinar si estos cambios no eran polimorfismos frecuentes del gen *SH3TC2* y considerando que ambos cambios predicen una proteína truncada, se estudió 226 cromosomas control de población española y 20 cromosomas control de población gitana española. En ninguno de ellos encontramos la mutación p.R1109X, por lo que se postuló que no era un polimorfismo y sí la mutación causante de la enfermedad en la mayoría de nuestros pacientes. La mutación p.C737_P738delinsX, se analizó mediante

secuenciación directa del producto de PCR correspondiente al exón 11 en 20 cromosomas de población control no encontrándose dicho cambio lo que sugiere que es la segunda mutación patogénica en la familia LF235/LF402.

A

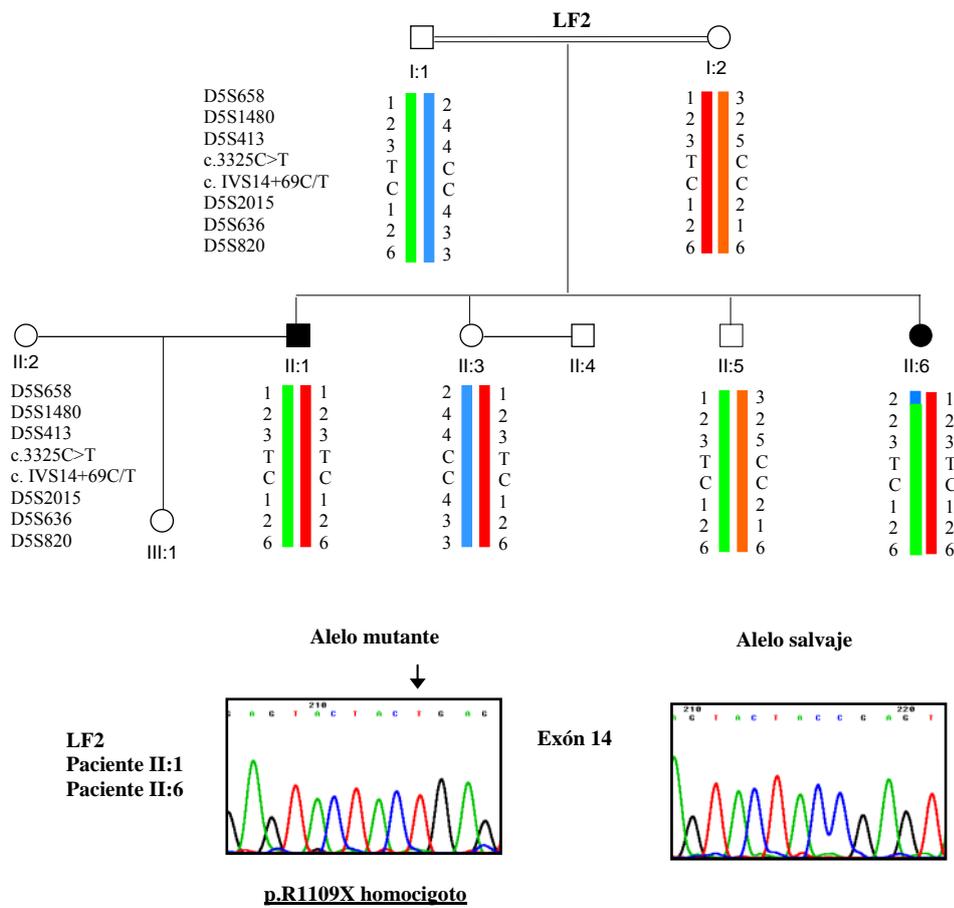


Figura 56.- Análisis de mutaciones de SH3TC2 en la familia LF2. A: en esta figura se muestran los haplotipos con la mutación p.R1109X (c.3325C>T) correspondiente a la familia LF2. Los pacientes II:1 y II:6 son homocigotos para la mutación p.R1109X mientras que los padres y hermanos son portadores sanos para dicha mutación. B: electroforegrama de la mutación p.R1109X en el gen SH3TC2 en los pacientes enfermos de la familia LF2.

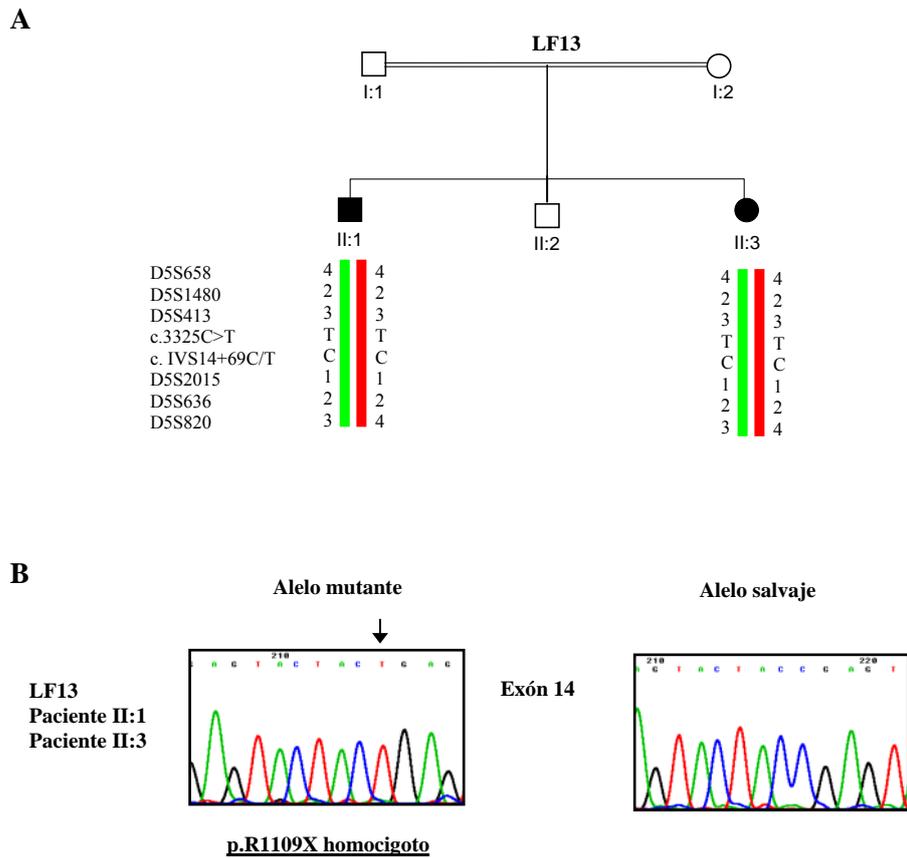
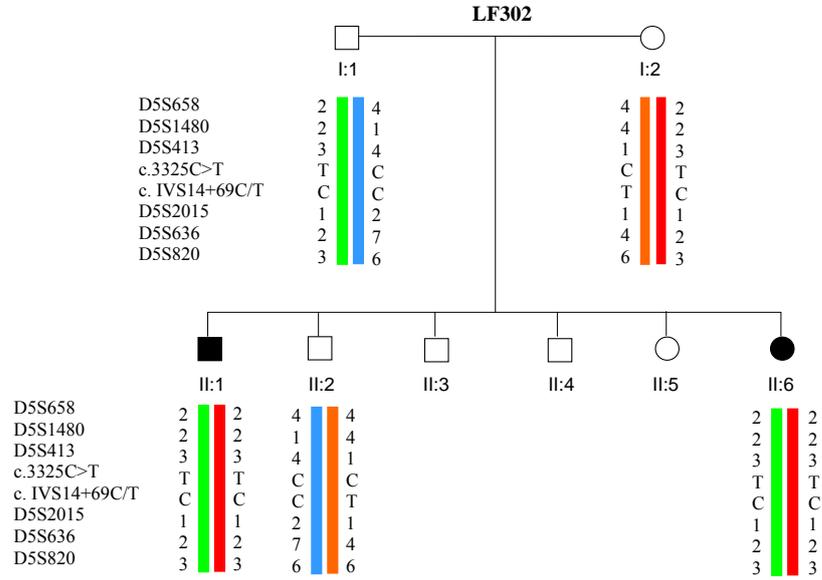


Figura 57.- Análisis de mutaciones de SH3TC2 en la familia LF13. A: en esta figura se muestran los haplotipos con la mutación p.R1109X (c.3325C>T) correspondiente a la familia LF13. Los pacientes II:1 y II:3 son homocigotos para la mutación p.R1109X. B: electroforegrama de la mutación p.R1109X en el gen SH3TC2 en los pacientes enfermos de la familia LF13.

A



B

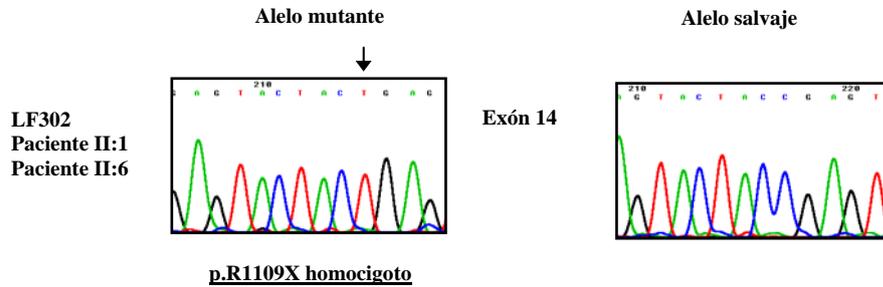
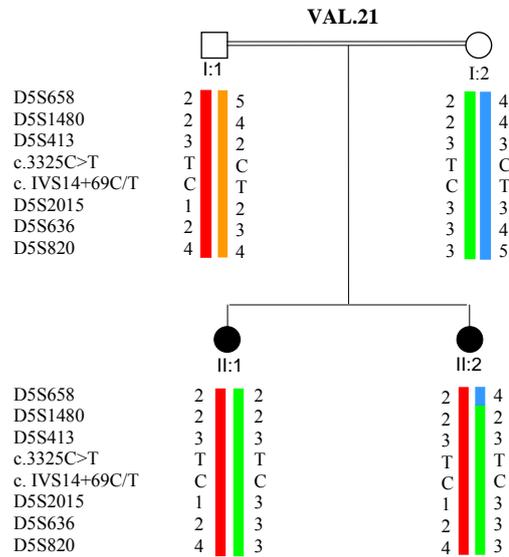


Figura 58.- Análisis de mutaciones de SH3TC2 en la familia LF302. A: en esta figura se muestran los haplotipos con la mutación p.R1109X (c.3325C>T) correspondiente a la familia LF13. Los pacientes II:1 y II:6 son homocigotos para la mutación p.R1109X. B: electroforegrama de la mutación p.R1109X en el gen SH3TC2 en los pacientes enfermos de la familia LF302.

A



B

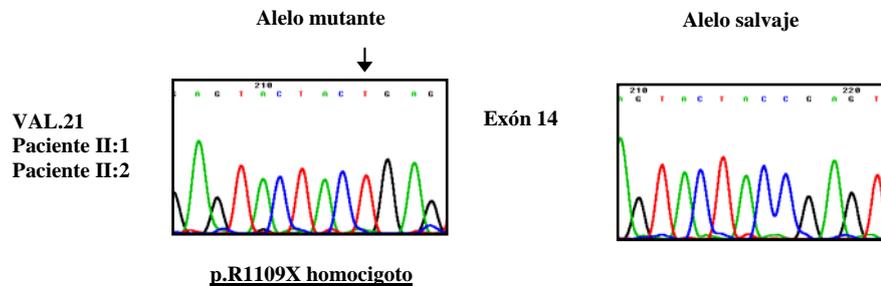


Figura 59.- Análisis de mutaciones de SH3TC2 en la familia VAL.21. A: en esta figura se muestran los haplotipos con la mutación p.R1109X (c.3325C>T) correspondiente a la familia VAL.21. Los pacientes II:1 y II:2 son homocigotos para la mutación p.R1109X. B: electroforegrama de la mutación p.R1109X en el gen SH3TC2 en los pacientes enfermos de la familia VAL.21.

A

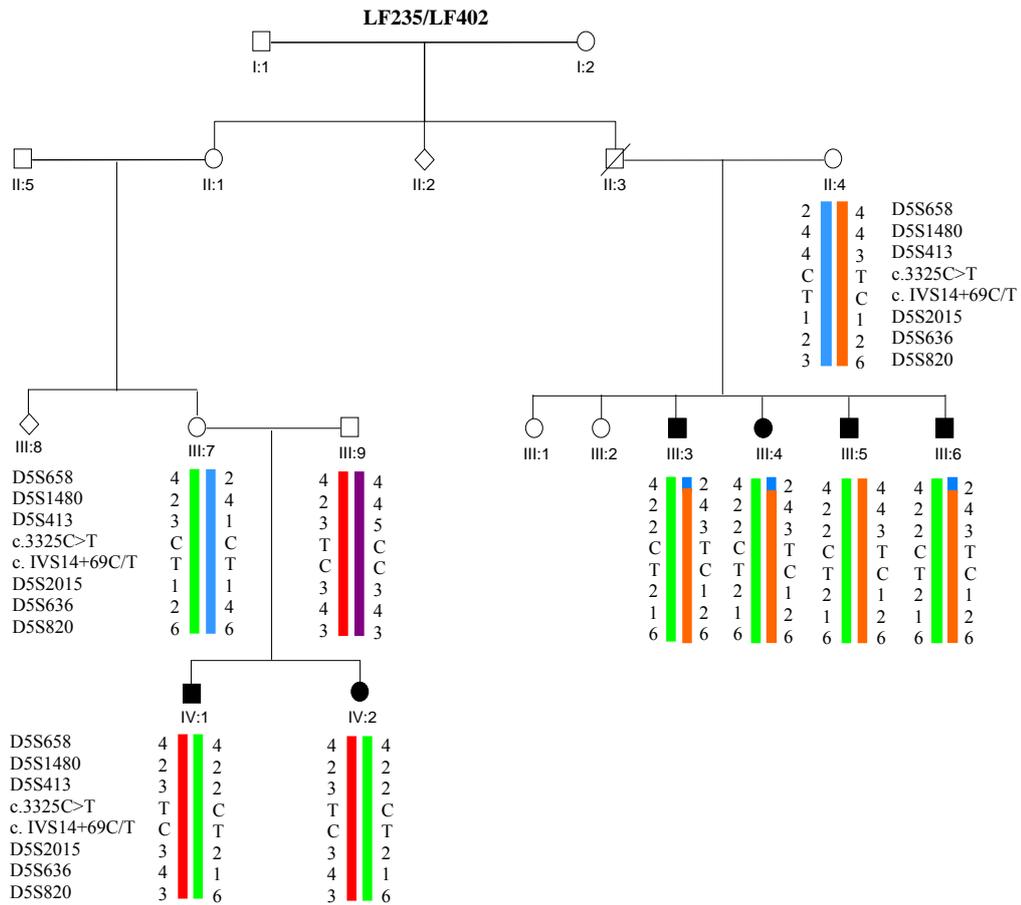


Figura 60a.- Análisis de mutaciones de SH3TC2 en la familia LF235/LF402. A: en esta figura se muestran los haplotipos con la mutación p.R1109X (c.3325C>T) correspondiente a la familia LF235/LF402. Los pacientes III:3, III:4, III:5, III:6, IV:1 y IV:2 son heterocigotos compuestos para la mutaciones p.R1109X y p.C737_P738 delinsX. El cromosoma portador de la mutación p.C737_P738 delinsX está representado por un barra de color verde, mientras que los cromosomas portadores de la mutación p.R1109X están representados por una barra de color naranja o rojo en función de su origen materno o paterno, respectivamente.

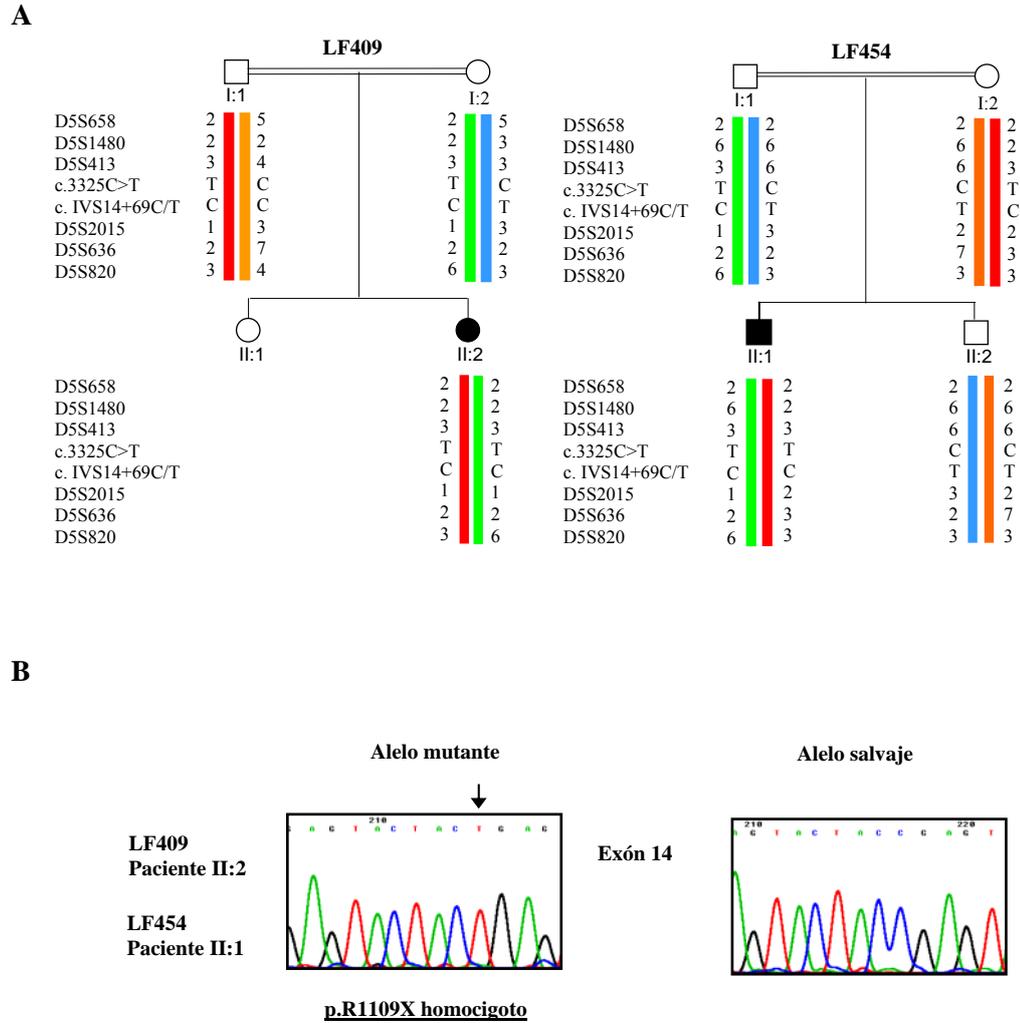


Figura 62.- Análisis de mutaciones de SH3TC2 en los casos esporádicos LF409 y LF454. A: en esta figura se muestran los haplotipos con la mutación p.R1109X (c.3325C>T) correspondiente a los casos esporádicos LF409 y LF454. La paciente II:2 de la familia LF409 y el paciente II:1 de la familia LF454 son homocigotos para la mutación p.R1109X; B: electroforegrama de la mutación p.R1109X en el gen SH3TC2 en los casos esporádicos LF409 y LF454.

5.- Discusión

5.1.- ANÁLISIS GENÉTICO DEL GEN *GDAP1*

La enfermedad de CMT tipo 4A causada por la presencia de mutaciones en el gen *GDAP1* muestra una gran variabilidad fenotípica. Esta enfermedad fue originariamente descrita en familias con neuropatía desmielinizante grave cartografiada en el cromosoma 8q13-21.1 y asociada a formas autosómicas recesivas. Sin embargo, mutaciones en el gen *GDAP1* también han sido descritas en pacientes con fenotipo desmielinizante (Ben Othmane *et al.*, 1993a; Nelis *et al.*, 2002; Ammar *et al.*, 2003), en pacientes con fenotipo axonal (Sevilla *et al.*, 2003; Boerkoel *et al.*, 2003; Birouk *et al.*, 2003; Azzedine *et al.*, 2003a; Ammar *et al.*, 2003), e incluso en pacientes con un fenotipo intermedio (Senderek *et al.*, 2003). La variabilidad intrafamiliar también ha sido descrita en hermanos homocigotos para la mutación p.R161H (Ammar *et al.*, 2003). Sin embargo, la variabilidad fenotípica observada en pacientes con mutaciones *GDAP1* no es exclusiva de esta forma, ya que otras existen otras formas de CMT que también pueden originar fenotipos desmielinizantes y axonales como es el caso de las formas causadas por mutaciones en el gen *MPZ* y en el gen *GJB1* (Vance, 2000).

5.1.1.- Mutaciones en el gen *GDAP1*

De las 118 familias de origen español remitidas a nuestro grupo para el análisis genético del gen *GDAP1*, detectamos la presencia de seis mutaciones diferentes, cinco de las cuales habían sido publicadas anteriormente en familias con CMT4A o con ARCMT2 de origen geográfico diferente (Baxter *et al.*, 2002; Cuesta *et al.*, 2002; Ammar *et al.*, 2003) y una nueva mutación (Claramunt *et al.*, 2005) en 11 familias no emparentadas entre sí. Hasta ese momento las mutaciones descritas en el gen *GDAP1* se habían identificado en casos familiares y no habían sido caracterizadas en casos esporádicos. En nuestra serie de estudio sin embargo, encontramos mutaciones en nueve casos esporádicos y en dos familias que parecían segregar de forma autosómica dominante. La presencia de mutaciones en estos nueve casos esporádicos representa casi el 10% de los pacientes con

Discusión

mutaciones en el gen *GDAP1* de nuestra serie con 91 casos esporádicos estudiados, sugiriendo que el análisis de mutaciones en el gen *GDAP1* podría estar indicado en casos esporádicos con CMT. A pesar de que no hay estudios, incluir al gen *GDAP1* en el diagnóstico molecular de rutina de pacientes con CMT podría depender de la prevalencia de la forma CMT4A o ARCMT2 de cada país.

Ocho de los nueve casos esporádicos fueron homocigotos para la mutación p.Q163X (LF135, VAL.3, VAL.4, VAL.25, VAL.28, VAL.29) o heterocigotos compuestos (VAL.5: p.Q163X/p.E114fsX; LF127: p.S194X/p.T288fsX3), mientras que un paciente fue heterocigoto para la mutación p.T157P (VAL.8) originada como consecuencia de un evento “*de novo*”, no encontrándose otra mutación patogénica en el gen *GDAP1*. Así pues, la presencia de la mutación p.T157P en el caso esporádico de la familia VAL.8, parecía expresarse como una mutación dominante, ya que el estudio genético en ambos padres indicó que no eran portadores de dicha mutación y los estudios clínicos mostraban que no presentaban síntomas de la enfermedad. En ninguno de los casos estudiados había consanguinidad.

Un patrón de herencia autosómico dominante no había sido descrito anteriormente en pacientes esporádicos y familias con CMT causado por la presencia de mutaciones en el gen *GDAP1*, sin embargo nosotros proponemos que un caso esporádico (VAL.8) con la mutación p.T157P y dos familias (LF292 y LF293) con la mutación p.R120W en heterocigosis de nuestra serie podrían segregar de modo autosómico dominante. En el caso de la mutación p.R120W existen tres argumentos a nuestro favor para considerarla como una mutación patogénica y por tanto, responsable de la enfermedad en las familias LF292 y LF293. En primer lugar, la arginina 120 es un residuo altamente conservado en la proteína *GDAP1* que pertenece a una subfamilia de las GSTs (Marco *et al.*, 2004), y cuando está se altera se asocia con la enfermedad: la mutación p.R120Q en homocigosis descrita en un paciente japonés con neuropatía de Déjérine-Sottas (Boerkoel *et al.*, 2003), y la mutación p.R120W asociada con otra mutación

p.G271R ha sido descrita en un paciente que manifiesta una neuropatía autosómica recesiva grave con VCN disminuída y reducción de los potenciales de acción motores (CMAP) y sensitivos (SNAP) (Ammar *et al.*, 2003); en ambos padres los padres heterocigotos no presentaban síntomas de la enfermedad. La arginina 120 está localizada cerca del final del dominio I de la GST; esto podría sugerir que el cambio aminoacídico p.R120W podría afectar de manera relevante a la función de la proteína GDAP1. En segundo lugar, esta sustitución nucleotídica no ha sido encontrada en 196 cromosomas control españoles. En tercer lugar, en nuestras familias la mutación p.R120W segrega asociada con la enfermedad. En la familia LF292, siete pacientes pertenecientes a tres generaciones del árbol genealógico fueron portadores de la mutación y se asocian al haplotipo 7-3-5-T-5-6-6, sugiriendo que esta mutación podría ser patogénica. El hallazgo de la mutación p.R120W en dos hermanos de la familia LF293 también sugiere que la mutación podría tener un efecto patogénico en el nervio. La tercera mutación que parece expresarse como dominante en un caso esporádico, p.T157P, es más problemática. En este caso la mutación únicamente fue detectada en el probando por lo que nos planteamos que se trataba de un suceso *de novo*. A pesar de ello, consideramos que la mutación p.T157P podría ser considerada como patogénica por el hecho de que el cambio de aminoácido es una sustitución no conservativa y la treonina 157 también está altamente conservada en la proteína GDAP1, que pertenece a una subfamilia de las GSTs (Marco *et al.*, 2004). Además, este cambio de nucleótido no fue observado en 196 cromosomas control españoles.

Cabe mencionar que de las 118 familias de nuestra serie de estudio encontramos mutaciones en el gen *GDAP1* en 11 de ellas, sin embargo en las 107 familias restantes no encontramos mutaciones en este gen. Esto sugiere que en estas 107 familias, en las que se descartaron previamente las formas más frecuentes de CMT antes del análisis genético en el gen *GDAP1*, estén causadas bien por la presencia de mutaciones en otros genes responsables de la enfermedad de CMT o bien en genes que no hayan sido aún identificados.

5.1.2.- Variabilidad fenotípica en pacientes con mutaciones en el gen *GDAP1*

Hemos visto que de las 11 familias de nuestra serie de estudio con mutaciones en el gen *GDAP1* diferenciamos 2 grupos: 1) 8 casos esporádicos (LF127, LF135, VAL.3, VAL.4, VAL.5, VAL.25, VAL.28, VAL.29) que presentan 2 mutaciones en el gen *GDAP1*, y con un patrón de herencia autosómico recesivo, y 2) un caso esporádico (VAL.8) y 2 familias (LF292 y LF293), con una única mutación y con posible patrón de herencia autosómico dominante.

En el primer grupo, todos los pacientes muestran un fenotipo clínico similar, caracterizado por un inicio temprano de la enfermedad, asociada a debilidad y atrofia muscular predominantemente distal, deformidad en los pies, arreflexia tendinosa, sin pérdida de sensibilidad y en la mayoría de casos está asociado a disfonía o parálisis de cuerdas vocales. La necesidad de silla de ruedas aparece al final de la primera década de vida o principio de la segunda. Algunas de las características fenotípicas observadas, como la aparición temprana de la enfermedad no es específica de esta forma de CMT, habiéndose descrito en otras formas de CMT con herencia autosómica recesiva, particularmente en las formas CMT4B1, CMT4E y CMT4F causadas por la presencia de mutaciones en los genes *MTMR2*, *EGR2* y *PRX*, respectivamente. La disfonía, con evidencia o no de parálisis de cuerdas vocales fue descrita en tres familias españolas cuyos pacientes fueron homocigotos para la mutación p.Q163X o heterocigotos compuestos con la mutación p.Q163X y otras mutaciones, p.S194X o p.T288fsX290 (Cuesta *et al.*, 2002; Sevilla *et al.*, 2003), así como también en tres familias norteamericanas de origen hispanoamericano, cuyos pacientes fueron homocigotos para la mutación p.Q163X (Boerkoel *et al.*, 2003), sugiriendo que dicha característica pudiera estar asociada a esta mutación en particular. Sin embargo, en nuestra serie de estudio la disfonía se ha descrito en 6 de los 8 casos esporádicos, siendo los pacientes homocigotos para la mutación p.Q163X, a excepción del paciente de la familia VAL.5, heterocigoto compuesto p.Q163X y p.E114fsX. Esto nos sugiere que dicha

característica no está asociada únicamente a esta mutación al no estar presente en el caso esporádico VAL.5 y por otro lado, esta misma característica ha sido descrita en pacientes con otras mutaciones en el gen *GDAP1*, como es el caso de un paciente heterocigoto compuesto con las mutaciones p.S194X y p.R310Q (Azzedine *et al.*, 2003a). En relación con la deambulación, al menos 4 pacientes de nuestra serie (LF127, VAL.3, VAL.25 y VAL.29) precisaron silla de ruedas al final o principio de la segunda década de vida, mientras que dos pacientes (VAL.5 y VAL.28) aún podían andar en el momento del estudio genético. Los pacientes de las 3 familias españolas en las que originariamente se describieron mutaciones en el gen *GDAP1* requieren todos de silla de ruedas. Estos datos demuestran la variabilidad fenotípica que existe en pacientes con mutaciones en el gen *GDAP1*, ya que idénticas mutaciones pueden dar lugar a diferentes variantes fenotípicas. En cualquier caso, la presencia de dos mutaciones en el gen *GDAP1* causa un fenotipo grave, de aparición temprana y con herencia autosómica recesiva.

La neurofisiología y la biopsia del nervio sural en estos pacientes indican lesión axonal. Las VCN fueron normales o ligeramente reducidas, característico de las formas axonales o CMT2. En general, los potenciales de acción motores (CMAP) y sensitivos (SNAP) estaban reducidos, hecho que también va a favor de que la lesión primaria del nervio es axonal. Dos pacientes, probandos de las familias LF135 y LF127, tenían potenciales de acción enormemente disminuidos.

En el segundo grupo, observamos que el paciente esporádico de la familia VAL.8 presenta un fenotipo axonal grave, de aparición en la primera década de vida y asociado con atrofia óptica, mientras que los pacientes de las familias LF292 y LF293 presentan un fenotipo axonal menos grave en tanto que la enfermedad aparece en la segunda década de vida e incluso más tarde y con capacidad autónoma para andar (como el paciente enfermo I-1 de la familia LF292 con 70 años de edad). Esto sugiere que la presencia de una u otra mutación pudiera estar correlacionada con la gravedad de la enfermedad. Por otro lado, el fenotipo clínico mostrado por los pacientes de las familias LF292 y LF293 con la mutación

p.R120W en heterocigosis contrasta con el fenotipo observado en un paciente heterocigoto compuesto con la mutación p.R120W y p.G271R (Ammar *et al.*, 2003), que presenta un fenotipo axonal grave de aparición temprana con necesidad de silla de ruedas a los 12 años. Este paciente heredó la mutación p.R120W del padre fallecido y la mutación p.G217R de la madre, por tanto era imposible conocer si el padre desarrolló o no los síntomas de la enfermedad de CMT. Dado que no podemos comparar el fenotipo clínico del padre portador de la mutación p.R120W con el mostrado por los pacientes enfermos de la familia LF292, es posible que la mutación p.R120W pueda dar lugar a fenotipos diferentes, en función de si se presenta en heterocigosis o asociada con otra mutación.

Recientemente, Chung y colaboradores (2008) han descrito la mutación p.Q218E en heterocigosis en el gen *GDAP1* en dos pacientes de una familia con descendencia coreana que parece expresarse también de forma autosómica dominante, siendo el fenotipo clínico descrito en estos pacientes similar al descrito en nuestros pacientes con la mutación p.R120W. Los pacientes con la mutación p.Q218E comenzaron a tener síntomas de la enfermedad entre la segunda y tercera década de vida y con capacidad autónoma para andar.

Esto sugiere que, aunque son necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis de herencia autosómica dominante, existen diferencias fenotípicas entre pacientes con AR CMT y pacientes con posible AD CMT. De hecho, las características clínicas mostradas por la presencia de mutaciones en el gen *GDAP1* en pacientes con AR CMT, generalmente presenta una aparición muy temprana de la enfermedad con un fenotipo severo, en ocasiones asociado con disfonía o parálisis de cuerdas vocales, parálisis del diafragma, o cifoescoliosis (Birouk *et al.*, 2003; Stojkovic *et al.*, 2004) y la necesidad de silla de ruedas al principio de la segunda década de vida debido fundamentalmente a la debilidad y atrofia de la musculatura predominantemente distal. No obstante, la dualidad de fenotipos ha sido descrita dentro de una familia AR CMT con la misma mutación en el gen *GDAP1* (Nelis *et al.*, 2002). Sin embargo, en los pacientes con mutaciones en el

gen *GDAP1* que parecen expresarse como autosómicas dominantes presentan una aparición de la enfermedad al final de la segunda década de vida, asociado con un fenotipo moderado y con capacidad autónoma para andar (Claramunt et al., 2005; Chung *et al.*, 2008), a excepción de la paciente con la mutación p.T157P que presenta un fenotipo más grave asociado con atrofia óptica y de aparición temprana.

5.1.3.- Origen de las mutaciones p.Q163X, p.S194X y p.T288fsX290 y efecto fundador.

La mutación p.Q163X es la más recurrente de nuestra serie de estudio, estando presente en 13 cromosomas. Esta mutación se había descrito anteriormente en tres familias españolas, presente en 4 cromosomas (Cuesta *et al.*, 2002), que fueron incluidas en este estudio para el análisis de segregación de haplotipos. Así pues, nuestra serie consta de 17 cromosomas con la mutación p.Q163X (Fig. 28, ver pág. 104 Resultados).

Si consideramos los alelos mutados de nuestra serie de estudio e incluimos los de las tres familias españolas LF38, LF249 y LF20 (Cuesta *et al.* 2002), la frecuencia estimada para la mutación p.Q163X en población española es del 68%. Dado que esta mutación explica el 68% de los alelos patogénicos en casos esporádicos y familias españolas de nuestra serie de estudio, nos planteamos la posibilidad de que dicho alelo mutante pudiera haberse originado en la península ibérica, y que los pacientes de nuestra serie y familias que segregan con el fenotipo ARCMT2 causado por mutaciones en el gen *GDAP1* fueron consecuencia de un efecto fundador ancestral común.

Para confirmar nuestra hipótesis de trabajo, procedimos a la construcción del haplotipo en los 17 cromosomas portadores de la mutación p.Q163X. El análisis de haplotipos reveló la existencia de un haplotipo común mayoritario (C-7-3-5-G-3-6-6) presente en ocho de los 17 cromosomas mutados (A, B, D, I, J, K, L, M) (Fig. 28, ver pág. 104 Resultados), sugiriendo que podría tratarse del haplotipo

Discusión

ancestral común, y que el resto de haplotipos asociados con la mutación p.Q163X (C-5-3-5-G-3-6-6; T-5-3-5-G-2-6-6; C-6-3-5-G-3-6-6; T-3-3-5-G-3-6-6; C-5-3-5-G-5-6-6; C-7-2-4-G-3-5-6), presentes en los 9 cromosomas restantes (E; F; G, P, Q; H; N, O; C) (Fig. 28, ver pág. 104 Resultados), en los que se observan variaciones alélicas con respecto a algunos de los marcadores microsatélites, serían el resultado bien de recombinaciones ancestrales o bien de mutaciones en el número de repeticiones. Por tanto, existiría un único haplotipo asociado con la mutación p.Q163X en población española demostrando un origen ancestral común para dicha mutación.

Curiosamente, la mutación p.Q163X no se ha encontrado en pacientes procedentes de otros países a excepción de tres familias norteamericanas de origen hispánico (Boerkoel *et al.*, 2003). Estas tres familias, cuyos pacientes fueron homocigotos para la mutación p.Q163X fueron incluidas en el análisis de haplotipos utilizando los mismos marcadores microsatélites y SNPs. Pudimos mostrar en cuatro de los seis cromosomas el haplotipo común mayoritario (C-7-3-5-G-3-6-6) y dos de ellos mostraron variaciones con respecto al marcador D8S279 (T-3-3-5-G-3-6-6 y C-5-3-5-G-3-6-6) (Fig. 28, ver pág. 104 Resultados).. Dado que se observa un haplotipo común asociado con la mutación p.Q163X en pacientes hispanoamericanos, nos indica que pueda tratarse de una mutación fundadora con un posible origen en la península Ibérica.

Por otro lado, idénticas variaciones con respecto a los marcadores rs1025928 y D8S279 encontradas en cuatro cromosomas españoles (E, H, N y O) también fueron observadas en dos cromosomas de origen hispánico (R y S). Esta coincidencia sugiere que la divergencia del marcador D8S279 podría haber ocurrido antes de que los individuos portadores de dicha mutación hubieran migrado al continente americano. Por consiguiente, la serie más probable de acontecimientos es que la mutación p.Q163X migrara de la península ibérica al continente americano en tres movimientos migratorios separados.

La mutación p.S194X, había sido descrita anteriormente en familias españolas (Cuesta *et al.*, 2002), tunecinas (Baxter *et al.*, 2002) y marroquíes (Nelis *et al.*, 2002; Azzedine *et al.*, 2003a; Birouk *et al.*, 2003). La presencia de homocigosidad para esta mutación en los pacientes de 2 familias de origen marroquí no emparentadas entre sí, sugirió que dicha mutación podría tener un origen común. Al realizar el análisis de haplotipos en las dos familias españolas de nuestra serie de estudio (LF127 y LF249) y en una familia belga de origen marroquí (PN860), confirmamos el origen común para dicha mutación (Fig. 30, ver pág. 110 Resultados). También observamos que la mutación p.T288fsX3 encontrada en dos cromosomas de dos familias no emparentadas entre sí de nuestra serie de estudio, tenía un origen común (Fig. 31, ver pág. 111 Resultados). Por tanto, hemos demostrado que tres mutaciones encontradas en población española son consecuencia de efectos fundadores, como se sugiere por la ausencia de portadores de estas tres mutaciones en población control. La presencia de estas tres mutaciones (p.Q163X, p.S194X, p.T288fsX3) para las que se demuestra un efecto fundador representadas en un 68%, 8% y 8% respectivamente, en nuestra serie española, deberían ser incluidas en el diagnóstico molecular de CMT4A en familias españolas.

5.1.4.- Mutaciones y proteína GDAP1

La proteína GDAP1 inferida de la ORF del gen *GDAP1* está formada por 358 aminoácidos. Codifica una proteína con dos dominios transmembrana y una región que contiene un dominio GST. Las enzimas glutatión S-transferasas (GSTs) son conocidas por su función en rutas antioxidantes y de detoxificación. Sin embargo, poco se conoce sobre la función de GDAP1. Esto posiblemente, limite el poder establecer las correlaciones fenotipo-genotipo. La proteína GDAP1 se localiza en la membrana mitocondrial externa (Niemann *et al.*, 2005; Pedrola *et al.*, 2005), y su sobreexpresión induce la fragmentación de la mitocondria y parece estar implicada en la ruta de fisión de las mitocondrias dinámicas (Pedrola *et al.*,

2005). De las 6 mutaciones en el gen *GDAP1* detectadas en nuestra serie, 4 de ellas (p.Q163X, p.S194X, p.E114fsX, p.T288fsX3) truncan la proteína (uno o más dominios son eliminados) para las que se propone una pérdida de función. En el caso de las mutaciones no sinónimas la patogénesis es más difícil de explicar. Pedrola L. y colaboradores (2008) realizaron un estudio en el que mediante el análisis de sobreexpresión de un grupo de mutaciones no sinónimas, entre las que se incluyen las dos mutaciones no sinónimas detectadas en este estudio (p.R120W, p.T157P), observaron un patrón fragmentado de la mitocondria similar al patrón obtenido de la sobreexpresión de la proteína GDAP1, lo cual sugiere que otros posibles mecanismos de pérdida de función pueden causar la enfermedad. La mutación p.R120W, descrita en un paciente heterocigoto compuesto con otra mutación p.G271R (Ammar *et al.*, 2003) y en dos familias en este estudio (LF292 y LF293), mostró un patrón de expresión idéntico al mostrado por la proteína *wild type* y otras mutaciones no sinónimas, sugiriendo provisionalmente que el mecanismo patogénico puede ser diferente cuando solo existe esta única mutación o cuando otro alelo mutante está presente. Las células sobreexpresadas con la mutación p.T157P, encontrada en un caso esporádico en el presente estudio (VAL.8), mostró un patrón de agregación en la mitocondria, especialmente perinuclear; esto sugiere que esta mutación podría estar actuando como un efecto dominante negativo, incrementando el proceso de fusión de la mitocondria (Pedrola *et al.*, 2008). Así pues, el efecto patogénico de estas mutaciones no sinónimas parece alterar a las mitocondrias dinámicas afectando principalmente al proceso de fusión.

5.2.- ANÁLISIS DE EXCLUSIÓN DE GENES CANDIDATOS

Tras los resultados encontrados en nuestra serie en la que definimos por un lado, la posible herencia autosómica dominante asociada al gen *GDAP1* en dos familias (LF292 y LF293) y en un caso esporádico (VAL.8) (fenotipo CMT2K), y por otro lado descartamos el gen *GDAP1* como el responsable de la enfermedad de

CMT en 107 familias, nos planteamos dos directrices a seguir. En primer lugar, dado que hasta ese momento la presencia de mutaciones en el gen *GDAP1* no se había asociado a formas dominantes, nos planteamos la posibilidad de que mutaciones en otros genes próximos al locus CMT4A pudieran estar condicionando dicho fenotipo clínico. De los posibles genes candidatos encontrados próximos al locus CMT4A, elegimos el gen de la proteína de la mielina periférica 2 (*PMP2*) localizado en la misma región cromosómica que el locus CMT4A, 8q13-q21.1 (Ben Othmane *et al.*, 1993a), a una distancia física de ~7 Mb respecto del gen *GDAP1*, y por su posible implicación en la organización de la mielina compacta. Sin embargo, no encontramos ninguna mutación en los probandos de las dos familias y el caso esporádico, excluyéndolo como co-responsable de la enfermedad. Como segunda aproximación, habiéndose descartado previamente las formas más frecuentes de CMT, como la presencia de la duplicación CMT1A (17p11.2) y mutaciones puntuales en los genes *PMP22* (CMT1A), *MPZ* (CMT1B), *GJB1* (CMTX), decidimos ampliar el análisis genético a otros loci o a otros genes con el fin de definir la causa de la enfermedad. Inicialmente, descartamos la posibilidad de realizar estudios de análisis de ligamiento al no disponer de muestras de los padres y/o hermanos, disponíamos sólo del caso probando de cada familia, con lo que nos hubiera sido imposible definir la fase de segregación de los alelos en cada genealogía. Por ello, y debido a que durante la realización de este estudio se demostró que tanto el gen *GDAP1* como su parálogo en humanos, *GDAP1L1* localizado en el cromosoma 20q12, pertenecían a un nuevo grupo de proteínas GSTs (Marco *et al.*, 2004), y que el gen *GDAP1L1* codifica una proteína cuya secuencia proteica es similar a la de la proteína GDAP1, pensamos que este gen podía ser *a priori* un buen gen candidato. Tras el análisis de mutaciones en el citado gen detectamos dos variantes alélicas, el cambio no sinónimo p.E199K (c.595G>A) en dos casos esporádicos y el cambio sinónimo p.S240S (c.612C>T) en cuatro casos esporádicos y en dos pacientes pertenecientes a la misma familia. Demostramos que ambos cambios son

polimorfismos de baja frecuencia en la población española, el primero de ellos representado en un 1.2% y el segundo en 2.4% de los cromosomas. No encontramos cambios patogénicos en el gen *GDAP1L1* en estas 107 familias, excluyéndolo, pues, como el gen causante de la enfermedad de CMT en estos pacientes. Esto sugiere que pueden existir otros loci y/o genes responsables de la enfermedad en estos pacientes.

5.3- ANÁLISIS GENÉTICO Y MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD DE CHARCOT-MARIE-TOOTH AUTOSÓMICA RECESIVA EN FAMILIAS DE ETNIA GITANA

La población gitana europea, también conocida como pueblo *rom*, *roma* o romaní y cuyo número se estima entre 8-10 millones, es una población fundadora de orígenes comunes y que posteriormente se separó en múltiples grupos socialmente divergentes y geográficamente dispersos (Morar *et al.*, 2004). Recientemente, se han identificado nuevas enfermedades mendelianas y mutaciones específicas en la población romaní, atrayendo la atención de esta población fundadora previamente ignorada. Contrariamente a lo que ocurre en otras poblaciones fundadoras, cuya historia y genealogía habían sido previamente documentadas, la población romaní se caracteriza por una falta de registros de confianza, tradiciones nómadas y dispersa en una minoría étnica en numerosos países, que resulta en la necesidad de inferir su historia demográfica y genealogía a partir de los datos genéticos actuales.

Las formas autosómicas recesivas, causadas por mutaciones fundadoras específicas, explican la mayoría de casos descritos con CMT desmielinizante en la población europea de etnia gitana. Tres nuevas condiciones, asociadas con la neuropatía periférica hipo/desmielinizante, han sido identificadas y caracterizadas en esta población: la neuropatía sensitivo-motora hereditaria Lom (HMSN-Lom), la neuropatía sensitivo-motora hereditaria Russe (HMSN-Russe) y el síndrome de

neuropatía congénita con dimorfismo facial y cataratas (CCFDN), siendo la HMSN-Lom la forma más común.

5.3.1.- Análisis de exclusión de loci conocidos

En nuestra serie de estudio, formada por 8 familias no emparentadas entre sí y 9 casos esporádicos, todos ellos de etnia gitana y origen español, los pacientes habían sido diagnosticados clínicamente con una neuropatía sensitivo-motora desmielinizante y con un patrón de herencia autosómico recesivo, atendiendo a las características clínicas, electrofisiológicas y en ocasiones anatomopatológicas que fueron realizadas y/o supervisadas por el Servicio de Neurología del Hospital Universitario La Fe de Valencia, quienes observaron diferentes fenotipos clínicos en los pacientes enfermos. Este último dato nos sugirió que podría existir al menos otra forma de CMT además de las ya identificadas y caracterizadas en esta población, como la causante de la enfermedad en estos pacientes. En este sentido, inicialmente nos planteamos descartar los loci conocidos: HMSN-Lom y HMSN-Russe. Por otro lado, el síndrome CCFDN que se distingue por las anomalías oculares en los pacientes enfermos, fue excluido del análisis genético en los pacientes de nuestra serie de estudio debido a que por un lado, las características fenotípicas no se corresponden con las previamente publicadas en pacientes con CCFDN (Tournev *et al.*, 1999), y por otro lado, los estudios genéticos de las secuencias de ADN mitocondrial y análisis del cromosoma Y en pacientes con el síndrome CCFDN revelan una baja diversidad en este grupo indicando que es un grupo genéticamente cerrado con un efecto fundador reciente (Tournev *et al.*, 1999). De hecho, esta enfermedad ha sido encontrada en el grupo étnico gitano “*Wallachian Gypsies*”, caracterizado por ser un grupo de tamaño pequeño y estrictamente endogámico que migró desde Bulgaria en el año 1864 tras la abolición de la esclavitud hacia el Reino de Valaquia (*Wallachia* en rumano), y que todavía hablan un dialecto arcaico de Rumania y no la lengua romaní, característica del pueblo gitano.

5.3.1.1.- Locus HMSN-Lom (CMT4D)

La neuropatía sensitivo-motora hereditaria Lom (HMSN-Lom) fue originariamente descrita en pacientes de etnia gitana procedentes de Bulgaria y posteriormente identificada en varias familias de etnia gitana de distintos países europeos (Merlini *et al.*, 1998), siendo el defecto molecular en todos los pacientes HMSN-Lom estudiados la mutación sin sentido p.R148X en el gen *NDRG1*. Esta mutación se describió en homocigosis y se asocia con sordera (la cual suele presentarse en la tercera década de vida) (Kalaydjieva *et al.*, 2000).

Dado que, como previamente fue sugerido por Kalaydjieva y colaboradores (Kalaydjieva *et al.*, 1996), la HMSN-Lom es la forma más frecuente de la enfermedad de CMT autosómica recesiva en este grupo étnico, nos planteamos realizar el análisis directo de la mutación Lom, p.R148X, en los 29 pacientes enfermos de etnia gitana de nuestra serie de estudio, 20 de los cuales pertenecen a 8 familias no emparentadas entre sí y 9 son casos esporádicos. Únicamente encontramos la mutación en un caso esporádico, representada en un 3.5% de los pacientes estudiados de nuestra serie, lo que nos sugiere que existen otras formas de CMT que se asocian a este grupo étnico, como es el caso de la forma ligada al cromosoma 10 denominada Russe (Thomas *et al.*, 2001).

Como ya mencionamos anteriormente, la HMSN-Lom causada por la presencia de la mutación p.R148X en el gen *NDRG1* es la forma más frecuente de la enfermedad de CMT autosómica recesiva en este grupo étnico, para la que se propone un efecto fundador al igual que para otras cuatro mutaciones (IVS6+389C→T; 1267delG; p.C283Y; p.P28T) en los genes *CTDPI* (*C-Terminal domain of RNA polymerase II subunit A, phosphatase of, subunit 1*), *CHRNE* (*Cholinergic receptor, nicotinic, epsilon polypeptide*) *SGCG* (*Sarcoglycan, gamma*), *GALK1* (*Galactokinase 1*) causantes de las enfermedades CCFDN, CMS, LGMD2C y deficiencia de la galactokinasa respectivamente, presentes en diferentes grupos de población gitana (Morar *et al.*, 2004). No obstante, la

mutación p.R148X fue descrita en homocigosis en una paciente con características clínicas y neuropatológicas similares a las descritas en pacientes HMSN-Lom y que asocia sordera, de padres no consanguíneos y sin ancestros de etnia gitana (Baethmann *et al.*, 1998). Posteriormente, Hunter y colaboradores (2003) describieron una nueva mutación en el gen *NDRG1* en un paciente búlgaro no de etnia gitana con neuropatía desmielinizante grave cuyo fenotipo era muy similar al descrito en pacientes HMSN-Lom. Esta nueva mutación descrita en homocigosis en este paciente es una transición IVS8AS-1G-A en el sitio aceptor AG de *splice* en el intrón 8 del gen *NDRG1* que resulta en la pérdida del exón 9 de este gen. Estos datos nos indican que si bien la mutación p.R148X en el gen *NDRG1* causa la HMSN-Lom en pacientes de etnia gitana, no es exclusiva de este grupo étnico y por tanto, debería ser considerada en el diagnóstico de pacientes con síntomas de neuropatía desmielinizante asociada con sordera. Por otro lado, la neuropatía HMSN-Lom puede estar causada por la presencia al menos de otra mutación en el gen *NDRG1* en pacientes no de etnia gitana.

5.3.1.2.- Locus HMSN-Russe (CMT4G)

La neuropatía sensitivo-motora hereditaria Russe (HMSN-Russe) o CMT4G fue descrita inicialmente en familias de etnia gitana procedentes de Bulgaria (Rogers *et al.*, 2000), y posteriormente en familias gitanas de origen rumano y español (Thomas *et al.*, 2001). A partir de los estudios realizados en estas familias, el gen fue localizado mediante análisis de ligamiento en el cromosoma 10q23. El análisis de segregación de haplotipos en estas familias permitió localizar al gen HMSN-Russe en el intervalo flanqueado entre los marcadores microsatélites D10S1646-D10S1672, observándose un haplotipo común en todos los cromosomas de los enfermos, lo que les permitió sugerir la existencia de una única mutación fundadora.

Teniendo en cuenta estos resultados, nos planteamos con el fin de excluir o confirmar dicho locus como responsable de la enfermedad, en las 8 familias y 8 casos esporádicos de etnia gitana en los que previamente habíamos

descartado el locus HMSN-Lom, realizar el estudio de ligamiento bipuntual y el análisis de segregación de haplotipos de dicha región cromosómica. El análisis de ligamiento nos permitió excluir este locus en 5 familias y un caso esporádico, sin embargo obtuvimos valores *lod* positivos en 3 familias y 2 casos esporádicos. El máximo valor *lod* se obtuvo en la familia LF42 para el marcador D10S1647 ligado a este locus, siendo éste de 1,40; no obstante, estos valores *lod* obtenidos no nos permitían confirmar ni descartar ligamiento al locus HMSN-Russe. Por otro lado, al análisis de haplotipos reveló la existencia de un haplotipo común en dos familias (LF42, LF502) y un caso esporádico (LF444), presentando diferencias alélicas para el marcador D10S1647. Al comparar el haplotipo obtenido en nuestros pacientes de etnia gitana con los publicados anteriormente en otras familias de etnia gitana (Rogers *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2001), observamos que muestran una estrecha relación, aunque presentan diferencias alélicas con respecto a los marcadores D10S1647 y D10S1672. Dada la diversidad alélica observada en el haplotipo en nuestros pacientes, decidimos ampliar el haplotipo con un SNP localizado entre estos dos marcadores, obteniéndose el mismo alelo en las dos familias pero no en el caso esporádico. La diversidad en el haplotipo, como ocurre en estas dos familias y un caso esporádico de nuestra serie, también fue observada en el trabajo realizado por Morar y colaboradores (2004) sobre cinco mutaciones fundadoras descritas en población de etnia gitana, como mencionamos anteriormente en el apartado 5.3.1.1 de este capítulo (ver pág. 176), en el que la homocigosidad de la región conservada fue pequeña incluso entre pacientes de familias consanguíneas. Este patrón probablemente sea consecuencia de la historia del pueblo romaní; los grupos romaní de hoy en día son el producto de recientes fisiones de grandes poblaciones fundadoras. La edad alélica de la mutación causante de la enfermedad junto con la frecuencia de ésta misma en la población ancestral podría permitir la diversidad de los haplotipos asociados con la enfermedad en el momento de la división en lo que actualmente conocemos como grupos endogámicos y socialmente divergentes.

Así pues, en estas dos familias y el caso esporádico de nuestra serie que pueden segregarse con el fenotipo HMSN-Russe, nos sugieren que la diversidad en el haplotipo por un lado, podría haberse originado en la población ancestral, y de ser así, podríamos afirmar que la HMSN-Russe es probablemente una forma genéticamente homogénea, y causada por una única mutación fundadora que se expandió a través de Europa con la diáspora del pueblo gitano, como sucede con la HMSN-Lom; y por otro lado, la diversidad observada en el haplotipo podría sugerir que existiría más de una mutación que segregaría en estas familias.

En las 6 familias y 7 casos esporádicos en los que se excluimos la HMSN-Lom y HMSN-Russe, pueden existir otras formas de CMT que afectan a este grupo étnico.

5.3.2.- Análisis genético en las familias y casos esporádicos excluidos para los loci HMSN-Lom (CMT4D) y HMSN-Russe (CMT4G)

Las seis familias y 7 casos esporádicos diagnosticados como CMT4 o forma de CMT desmielinizante autosómica recesiva, en las que se habían descartado previamente dos de las neuropatías más comunes identificadas en la población gitana europea, HMSN-Lom y HMSN-Russe, presentaban mayoritariamente un fenotipo homogéneo. Particularmente, nos llamó la atención la aparición temprana y grave de la escoliosis en la mayoría de nuestros pacientes, así como también los hallazgos obtenidos a partir de las biopsias del nervio sural, en las que se observaron la pérdida de fibras mielinizadas y pequeñas formaciones en bulbo de cebolla debidas a una proliferación de la lámina basal. Tras revisar la bibliografía, observamos que la forma CMT4C causada por mutaciones en el gen *SH3TC2* y que había sido descrita en familias con distinto origen geográfico y no en población gitana, presentaba como característica diferencial con respecto a otras formas de CMT, la aparición temprana y grave de la escoliosis en la mayoría de los pacientes enfermos (Kessali *et al.*, 1997; Gabreëls-Festen *et al.*, 1999), y por otro

lado, las biopsias del nervio sural revelaron un incremento en la producción de la lámina basal así como también alteraciones en los procesos de formación de las células de Schwann (Senderek *et al.*, 2003a), siendo esta combinación de características morfológicas considerada por algunos autores como exclusivas de la forma CMT4C (Gabreëls-Festen *et al.*, 1999).

Así pues, basándonos en la información descrita en pacientes con CMT4C y debido a las coincidencias tanto clínicas como en las biopsias del nervio sural mostradas por los pacientes de etnia gitana de nuestra serie de estudio, nos planteamos confirmar o descartar el locus CMT4C en estos pacientes de etnia gitana, en primer lugar mediante el estudio de ligamiento bipuntual y el análisis de segregación de haplotipos de dicha región cromosómica (5q23-q33) y, en segundo lugar, el análisis de mutaciones en el gen *SH3TC2*. Por otro lado, decidimos incluir en este estudio las dos familias y un caso esporádico para los que sugerimos que podían cursar con el fenotipo HMSN-Russe, al no haberlo podido confirmar mediante el análisis de mutaciones del gen HMSN-Russe el cual se desconoce actualmente.

5.3.2.1.- Análisis de segregación mediante el estudio de ligamiento y de haplotipos al locus CMT4C en el cromosoma 5q23-q33

El estudio de ligamiento realizado en las 8 familias y 4 de los 8 casos esporádicos de etnia gitana, nos permitió descartar el locus CMT4C en dos familias (LF42 y VAL.15), mientras que en las seis familias y cuatro casos esporádicos restantes, aunque obtuvimos valores *lod* positivos para algunos de los marcadores microsatélites analizados, no nos permitían confirmar ligamiento a dicho locus en ninguno de los casos. No obstante, observamos que el máximo *lod score* se obtuvo para el marcador D5S413, al igual que se describió en estudios previos (Senderek *et al.*, 2003a), situado a 113,6 Kb en posición distal respecto del gen *SH3TC2* en todas las familias y casos esporádicos, a excepción de la familia LF502 y el caso esporádico VAL.9 para los que obtuvimos valores *lod* negativos. Particularmente,

nos llamó la atención el máximo *lod score* obtenido para este marcador en la familia LF235/LF402, que resultó en 2.71, que aunque no confirma ligamiento a dicho locus si que estaba muy próximo a 3.0, valor considerado como indicativo de ligamiento definitivo. Teniendo en cuenta por un lado, que los pacientes de nuestra serie de estudio presentaban un fenotipo bastante homogéneo, y que sólo disponíamos de 1 ó 2 generaciones del árbol genealógico de cada una de las familias y casos esporádicos para el análisis de ligamiento, y que el análisis de segregación de haplotipos mostraba la existencia de un haplotipo común mayoritario en nuestra serie de estudio, consideramos interpretar los resultados del análisis de ligamiento globalmente (realizando el sumatorio de los valores *lod* obtenidos para cada marcador). El máximo *lod score* se obtuvo para el marcador D5S413, que fue de 9.63, que en este caso si que indica ligamiento al locus CMT4C. En este sentido, sugerimos que la forma CMT4C podría ser la responsable de la enfermedad de CMT en estos pacientes de etnia gitana y por tanto, de ser así, sería la cuarta forma de neuropatía de CMT desmielinizante identificada en esta población.

Al mismo tiempo, construimos los haplotipos de todos los pacientes enfermos de las seis familias y ocho casos esporádicos (cuatro de los cuales no habían sido incluidos en el estudio de ligamiento al disponer únicamente del probando) para comprobar si existía un haplotipo común o varios asociados con la enfermedad. De los once haplotipos obtenidos (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI) (ver páginas 149 y 150), observamos que los haplotipos I, II, III, IV y V presentaron los mismos alelos (3-C) para los marcadores D5S413-c.IVS14+69C/T (ver pág. 150), más próximos al locus de la enfermedad, sugiriendo un origen común. En este sentido, dado que el haplotipo I fue el mayoritario en nuestra serie de estudio e idéntico para cinco marcadores microsatélites en 13 de los 29 cromosomas analizados (Fig. 54), la diversidad alélica para alguno de los marcadores mostrada por los haplotipos II, III, IV y V podrían ser la consecuencia de recombinaciones ancestrales o inestabilidad de los marcadores microsatélites.

Discusión

De ser así, nos estaría indicando que los 20 cromosomas portadores del haplotipo corto (3-C) podrían tener un origen común y podrían estar asociados con la presencia de una única mutación como la responsable de la enfermedad en estos pacientes. El mismo posible efecto fundador también fue observado por Gooding y colaboradores (2005) representando así, el cuarto efecto fundador asociado con las neuropatías periféricas desmielinizantes en la población romaní europea (Kalaydjieva *et al.*, 1996; Rogers *et al.*, 2001; Angelicheva *et al.*, 1999). Muchas enfermedades mendelianas causadas por mutaciones particulares en población romaní han sido descritas como mutaciones ancestrales, las cuales han estado presentes en este pueblo antes de la Diáspora y son, por tanto, mostradas por los pacientes de diferentes regiones geográficas en Europa (Kalaydjieva *et al.*, 2001). Esto se apoya en la en la observación de la diversidad de haplotipos con pequeñas regiones conservadas y de tan amplia distribución geográfica ((Kalaydjieva *et al.*, 2001; Morar *et al.*, 2004). Así, la posible descripción de una mutación en el gen *SH3TC2* en los pacientes con el haplotipo corto (3-C) podría ser consecuencia de una mutación fundacional relativamente reciente de nuestra población romaní. De hecho, otras publicaciones anteriores han descrito otros efectos fundadores específicos de población española de etnia gitana (Alvarez *et al.*, 2005; Callen *et al.*, 2005).

Con respecto al resto de haplotipos observados (VI, VII, VIII, IX, X y XI) (ver páginas 153 y 154), sugerimos que puedan estar asociados a mutaciones distintas o bien no estar asociados con la enfermedad. Dadas las características de esta población, en la que la identificación de diferentes enfermedades mendelianas la describen como genéticamente homogénea, encontrando una única mutación responsable de la enfermedad y un único haplotipo asociado, indicando un origen común y efecto fundador, cabe pensar que probablemente los haplotipos VII, VIII, IX, X y XI obtenidos no se asocien con la enfermedad. Estos haplotipos se asocian con los cromosomas de pacientes en los que los valores *lod* habían sido negativos para el locus CMT4C y/o clasificados genéticamente con posible fenotipo HMSN-

Russe (LF502, LF444 y VAL.9). Sin embargo, el haplotipo VI, dado que fue observado en un cromosoma de la familia LF235/LF402, cuyo máximo *lod score* para el marcador D5S413 es 2.71, localizado a tan sólo 113,6 Kb respecto del gen *SH3TC2*, nos hizo plantearnos la posibilidad de que podría existir al menos otra mutación en estos pacientes.

5.3.2.2.- Mutaciones en el gen *SH3TC2*

Tras los resultados obtenidos del análisis de ligamiento y segregación de haplotipos en las seis familias y 8 casos esporádicos de etnia gitana de nuestra serie, partíamos de la hipótesis de encontrar de 2 a 7 mutaciones en el gen *SH3TC2*. Tras el análisis de mutaciones en dicho gen en los pacientes de nuestra serie, identificamos dos mutaciones distintas: una sustitución en el exón 14 y una delección en el exón 11.

La primera de ellas, es una transición c.3325C>T, que produce una mutación sin sentido, p.R1109X, en el exón 14. El cambio de una arginina por un codón de parada da como resultado una proteína truncada. Esta mutación la encontramos en homocigosis en cuatro familias (LF2, LF13, LF302 y VAL.21) y cinco casos esporádicos (LF347, LF378, LF409, LF454 y LF476), y en heterocigosis en la familia LF235/402. La segunda mutación, es una delección de tres nucleótidos, c.2211-2213delCCC en el exón 11, que implica a dos aminoácidos de la proteína salvaje, p.C737_P738delinsX, y produce un desplazamiento de la pauta de lectura que termina en este mismo codón 738. Esta mutación se da en heterocigosis en la familia LF235/402.

Tras el análisis de haplotipos en estas mismas familias y casos esporádicos nos planteamos, por un lado que, la existencia de un haplotipo común corto (3-C) en 20 de los 29 cromosomas analizados probablemente tenían un origen común, y que pudiera estar asociado a la presencia de una única mutación como la responsable de la enfermedad en estos pacientes, y por otro lado que, la existencia de haplotipos diferentes pudieran estar asociados a mutaciones diferentes o no

asociados con mutaciones patológicas. En este sentido, hemos corroborado nuestra hipótesis de trabajo, en tanto que los haplotipos I, II, III, IV y V portadores del haplotipo corto (3-C) se asocian con la mutación p.R1109X, proponiendo al haplotipo I, mayoritario en nuestra serie, como el haplotipo ancestral común. La variabilidad observada en los haplotipos II, III, IV y V se puede explicar como resultado de recombinaciones ancestrales o inestabilidad de los marcadores microsatélites.

Con el fin de investigar la posible historia genética de la mutación p.R1109X en el gen *SH3TC2* en nuestra población romaní, nuestro grupo de trabajo posteriormente, realizó la estimación de esta mutación para la que se propone que surgió a finales del siglo XVIII (Claramunt *et al.*, 2007). Morar y colaboradores (2004) estimaron que la población romaní fue fundada hace aproximadamente de 32-40 generaciones con más recientes, secundarios y terciarios, eventos fundadores (aproximadamente hace 16-25 generaciones). Estos datos nos sugieren que la mutación p.R1109X en el gen *SH3TC2* podría haberse originado en una generación relativamente reciente. Contrariamente, Gooding y colaboradores (2005) detectaron la presencia de la mutación p.R1109X en el gen *SH3TC2* en familias españolas y turcas y, por tanto, se sugirió un origen ancestral extremadamente lejano. Sugerimos dos posibles explicaciones: o bien se trate de una mutación recurrente en el nucleótido CpG o bien, que se haya producido un reciente cuello de botella en la población romaní española. La primera explicación se apoya en el hecho de que el cambio nucleotídico c.3325C>T que produce la mutación p.R1109X en el gen *SH3TC2* está situado en un dinucleótido CpG. Este es un punto caliente de mutación en el genoma de vertebrados, que provoca transiciones CpG>TpG siendo el tipo más común asociado con mutaciones patogénicas (Antonarakis *et al.*, 2000). En tal caso, la mutación p.R1109X en el gen *SH3TC2* podría ser detectada tanto en pacientes de etnia gitana como en otros pacientes con CMT con una amplia distribución geográfica. De acuerdo con nuestros datos, la segunda alternativa sería más probable, en la que un pequeño

número de emigrantes portadores de la mutación p.R1109X en el gen *SH3TC2* se dividió en una casta o grupo tribal. Dicho grupo podría ser el origen de la actual distribución en España, y podría haber desempeñado el papel de un cuello de botella (Gresham *et al.*, 2001; Morar *et al.*, 2004). Por lo tanto, la estimación de la edad de la mutación p.R1109X en el gen *SH3TC2* en nuestra población implica el análisis de datos a partir del momento en que ocurrió el cuello de botella. Por otra parte, y hasta cierto punto, ambas ideas podrían ser ciertas y los resultados actuales descritos para la población gitana serían la consecuencia de ambos eventos en mayor o menor medida, como anteriormente se publicó para otros casos (Namekawa *et al.*, 2006). A excepción de la fenilcetonuria, las enfermedades Mendelianas en población gitana han sido descritas como genéticamente homogéneas con mutaciones fundacionales particulares en todos los pacientes (Kalaydjieva *et al.*, 2001).

La segunda mutación p.C737_P738delinsX, identificada en un único cromosoma correspondiente a la familia LF235/402, se asocia con el haplotipo VI (ver pág. 149); no obstante, este haplotipo también fue observado en dos cromosomas en un caso esporádico (LF421) para el que no hemos encontrado dicha mutación. Esto nos sugiere que probablemente dicha mutación no tenga un origen común, y que los resultados del análisis de ligamiento en esta familia (LF421) hayan sido casuales y no representan en realidad ligamiento al cromosoma 5q32-q33, al no encontrar ninguna mutación patológica en dicho gen. Por otro lado, el resto de haplotipos observados (VII, VIII, IX, X y XI) no se asocian con ninguna mutación patológica.

Ambas mutaciones caracterizadas en población gitana no han sido descritas en población caucasiana no de etnia gitana. En esta última población, diferentes mutaciones han sido descritas en el gen *SH3TC2* mostrando cierta heterogeneidad mutacional (Senderek *et al.*, 2003c). Por lo tanto, sería necesario la realización de otros estudios con muestras más amplias para determinar si ambas poblaciones comparten algunas mutaciones, probablemente debido a una mezcla poblacional

Discusión

como sucede con la fibrosis quística y la mutación $\Delta F508$ en el gen regulador de la conductancia transmembrana (ATP-binding cassette subfamily C, member 7) (Angelicheva *et al.*, 1997) o en la fenilcetonuria y las mutaciones p.R252W y IVS10nt546 en el gen de la fenilalanina hidrolasa (Kalanin *et al.*, 1994; Desviat *et al.*, 1997). Por ello, es tentador especular que la mutación p.R1109X en el gen *SH3TC2* es una mutación fundadora exclusiva de población gitana y que la mutación p.C737_P738delinsX en el gen *SH3TC2* tiene un origen diferente probablemente debido a una mezcla poblacional.

Así pues podemos decir que, además de los loci HMSN-Lom y HMSN-Russe, el locus CMT4C parece ser el responsable de la mayoría de casos de etnia gitana diagnosticados con CMT desmielinizante autosómico recesivo. Por otra parte, las neuropatías periféricas identificadas en la población gitana no explican todos los casos CMT4 de nuestra población y, por tanto, sugiere la existencia de al menos otra forma de CMT distinta a las ya caracterizadas, como la responsable de la enfermedad en estos pacientes.

6.- Conclusiones

Conclusiones

1.- El análisis genético del gen *GDAP1* en nuestra serie formada por 27 familias y 91 casos esporádicos con la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y de origen español, en los que previamente habían sido excluidas la duplicación de 1.5 Mb y la presencia de mutaciones en los genes *PMP22*, *MPZ* y *GJB1*, nos ha permitido detectar la presencia de mutaciones en 2 familias y 9 casos esporádicos, quedando representada la tasa de detección de mutaciones en el gen *GDAP1* en nuestra serie de estudio en un 13.5% en las familias y en un 10% en los casos esporádicos.

2.- Hemos encontrado 6 mutaciones distintas en el gen *GDAP1* en 11 pacientes de nuestra serie de estudio, tres de las cuales ya habían sido identificadas anteriormente, p.Q163X, p.S194X y p.T288fsX3, y caracterizado tres nuevas mutaciones, p.E114fsX, p.R120W y p.T157P. Las mutaciones son, pues, del tipo sin sentido, no sinónimas y con cambio de la pauta de lectura.

3.- La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth debida a mutaciones en el *GDAP1* muestra una gran heterogeneidad alélica y Mendeliana, con formas autosómicas recesivas graves (las formas más frecuentes) reconocidas como CMT4A, y formas autosómicas dominantes más moderadas en su expresión clínica e historia natural (CMT2K). En nuestra serie, las neuropatías causadas por mutaciones en el gen *GDAP1* se asocian siempre a una axonopatía.

4.- La mutación más frecuente en nuestra serie de origen español es p.Q163X, presente en 17 cromosomas. Esta mutación tiene un origen común ancestral en la península ibérica, siendo su distribución y frecuencia actual consecuencia de un efecto fundador.

5.- La mutación p.Q163X en pacientes tejanos de origen hispanoamericano tienen un origen en la península ibérica. La mutación viajó al Nuevo Mundo, probablemente en varios sucesos migratorios.

6.- La mutación p.S194X, encontrada en una familia española de nuestra serie y en diferentes familias de origen magrebí, aunque de diferentes países, tiene un origen común y único a todas ellas.

7.- La mutación p.T288fsX290, encontrada en 2 cromosomas de origen español tiene un origen común.

8.- El gen *GDAP1L1*, localizado en el cromosoma 20q12, ha sido excluido como responsable de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth en nuestra serie de estudio.

9.- La enfermedad de CMT presenta una gran heterogeneidad genética en la población gitana española, con tres loci/genes definidos, HMSN-Lom, HMSN-Russe y *SH3TC2*, y al menos existe un cuarto gen.

10.- La causa más frecuente en nuestra serie de estudio de población gitana española es la forma CMT4C, causada por mutaciones en el gen *SH3TC2*.

11.- Hemos detectado la presencia de dos nuevas mutaciones diferentes en el gen *SH3TC2*, la mutación sin sentido p.R1109X descrita en homocigosis en 4 familias y 5 casos esporádicos, y la mutación p.C737_P738delinsX, descrita en heterocigosis en una familia, no habiéndose descrito anteriormente ninguna otra mutación en este gen en población gitana.

Conclusiones

12.- El análisis de haplotipos de los 20 cromosomas portadores de la mutación p.R1109X confirma la existencia de un único origen para dicha mutación en la población de etnia gitana española con un haplotipo común: 2-3-C-1-2, presente en 13 de los 20 cromosomas analizados pudiendo ser explicadas las variaciones en los 7 cromosomas restantes, como consecuencia de eventos de recombinación o mutación de los marcadores microsatélites.

7.- Bibliografía

- Adams R., Murice V, Allan HR. (1999). Enfermedades de los nervios periféricos. *Principios de Neurología*: 1159-1162.
- Alvarez A, del Castillo I, Villamar M *et al.* (2005). High prevalence of the W24X mutation in the gene encoding connexin-26 (GJB2) in Spanish Romani (gypsies) with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Am J Med Genet A*: **137** (3): 255–258.
- Ammar N., Nelis E., Merlini L., *et al.* (2003). Identification of novel GDAP1 mutations causing autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscul Disord*: **13**: 720-728.
- Angelicheva D, Calafell F, Savov A *et al.* (1997). Cystic fibrosis mutations and associated haplotypes in Bulgaria—a comparative population genetic study. *Hum Genet*: **99** (4):513–520.
- Angelicheva D, Turnev I, Dye D, Chandler D, Thomas PK., and Kalaydjieva L. (1999). Congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy (CCFDN) syndrome: a novel developmental disorder in Gypsies maps to 18qter. *Eur J Hum Genet*, **7**: 560-566.
- Antonellis A, Ellsworth RE, Sambuughin N, *et al.* (2003). Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V. *Am. J. Hum. Genet*, **72** (1293-1299).
- Antonarakis SE, Krawczak M, Cooper DN. (2000). The nature and mechanisms of human gene mutation. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edn. New York: McGraw-Hill, 343–377.
- Auer-Grumbach M. (2004). Hereditary sensory neuropathies. *Drugs Today (Barc.)*, **40**: 385-394.
- Azzedine H, Ruberg M, Ente D., *et al.* (2003a). Variability of disease progression in a family with autosomal recessive CMT associated with a S194X and new R310Q mutation in the GDAP1 gene. *Neuromuscul Disord*, **13**: 341-346.
- Azzedine H, Bolino A, Taieb T, Birouk N, Di Duca M, Bouhouche A, Benamou S, Mrabet A, Hammadouche T, Chkili T, Gouider R, Ravazzolo R, Brice A, Laporte J, LeGuern E. (2003b). Mutations in MTMR13, a new pseudophosphatase homologue of MTMR2 and Sbf1, in two families with an autosomal recessive demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease associated with early-onset glaucoma. *Am J Hum Genet*, **72** (5): 1141-53.
- Azzedine H, Ravisé N, Verny C, Gabrëels-Festen A, Lammens M, Grid D, Vallat JM, Durosier G, Senderek J, Nouioua S, Hamadouche T, Bouhouche A, Guilbot A, Stendel C, Ruberg M, Brice A, Birouk N, Dubourg O, Tazir M, LeGuern E (2006). Spine deformities in Charcot-Marie-Tooth 4C caused by SH3TC2 gene mutations. *Neurology*, **22**; 67(4):602-6.

- Baethmann M, Göhlich-Ratmann G, Schröder JM, Kalaydjieva L, Voit T (1998). HMSNL in a 13-year-old Bulgarian girl. *Neuromuscul Disord.*, **8** (2):90-4.
- Barhoumi C, Amouri R, Ben Hamida C, et al. (2001). Linkage of a new locus for autosomal recessive axonal form of Charcot Marie-Tooth disease to chromosome 8q21.3. *Neuromuscul. Disord*, **11**: 27-34.
- Baxter R V, Ben Othmane K, Rochelle J M, et al. (2002). Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat. Genet*, **30**: 21-22.
- Ben Othmane K, Hentati F, Lennon F, et al. (1993a). Linkage of a locus (CMT4A) for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 8q. *Hum. Mol. Genet*, **2**: 1625-1628.
- Ben Othmane K, Middleton L T, Loprest L., et al. (1993b). Localization of a gene (CMT2A) for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 to chromosome 1p and evidence of genetic heterogeneity. *Genomics*, **17**: 1-6.
- Bennett C L, Shirk A J, Huynh H M, Street V A, et al. (2004). SIMPLE mutation in demyelinating neuropathy and distribution in sciatic nerve. *Ann.Neurol*, **55** (5): 713-720.
- Berger P, Sirkowski E, Scherer S S, Suter U. (2004). Expression analysis of the N-Myc downstream-regulated gene 1 indicates that myelinating Schwann cells are the primary disease target in hereditary motor and sensory neuropathy-Lom. *Neurobiol Dis*, **17** (2): 290-299.
- Berger P, Berger I, Schaffitzel C, Tersar K, Volkmer B, and Suter U. (2006). Multi-level regulation of myotubularin-related protein-2 (mtmr2) phosphatase activity by myotubularin-related protein-13/set-binding factor-2 (MTMR13/SBF2). *Hum. Mol.Genet. (Prepublication online)*.
- Bergoffen J, Scherer S S, Wang S, et al. (1993) Connexin, m. i. X-1. Charcot-Marie-Tooth, *et al.* (1993). Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science*, **262**: 2039-2042.
- Bird TD, Ott J, and Giblett E R. (1982). Evidence for linkage of Charcot-Marie-Tooth neuropathy to the Duffy locus on chromosome 1. *Am J Hum Genet* **34** (3): 388-394.
- Birouk N, Azzedine H, Dubourg O, et al. (2003). Phenotypical features of a Moroccan family with autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease associated with the S194X mutation in the GDAP1 gene. *Arch Neurol*, **60**: 598-604.
- Boerkoel CF, Takashima H, Bacino C A, Daentl D, and Lupski J R. (2001a). EGR2 mutation R359W causes a spectrum of Dejerine-Sottas neuropathy. *Neurogenetics*, **3**: 153-157.
- Boerkoel CF, Takashima H, Stankiewicz P, et al. (2001b). Periaxin mutations cause recessive Dejerine-Sottas neuropathy. *Am J Hum Genet*, **68**: 325-333.
- Boerkoel C F, Takashima H, Garcia C A, et al. (2002). Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies: Mutation distribution and genotype-phenotype correlation. *Ann Neurol*, **51**: 190-201.

- Boerkoel CF, M., PhD 1, Hiroshi Takashima, MD, PhD 1, Masanori Nakagawa, MD 2, Shuji Izumo, MD 3, Dawna Armstrong, MD 4, Ian Butler, MD 5, Pedro Mancias, MD 5, Sozos C. H. Papasozomenos, MD 6, Lawrence Z. Stern, MD 7, James R. Lupski, MD, PhD 1 8 * (2003). CMT4A: Identification of a Hispanic GDAP1 founder mutation. *Ann Neurol*, **53**: 400-5.
- Bolino A, Brancolini V, Bono F, et al. (1996). Localisation of a gene responsible for autosomal recessive demyelinating neuropathy with focally folded myelin sheaths to chromosome 11q23 by homozygosity mapping and haplotype sharing. *Hum Mol Genet*, **5**: 1051-1054.
- Bolino A, Muglia M, Conforti FL, LeGuern E, Salih MA, Georgiou DM, Christodoulou K, Hausmanowa-Petrusewicz I, Mandich P, Schenone A, Gambardella A, Bono F, Quattrone A, Devoto M, Monaco AP. (2000). Charcot-Marie-Tooth type 4B is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2. *Nat Genet*, **25** (1): 17-9.
- Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S. et al. (1999). Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*, **21**: 285-288.
- Bort S, Nelis E, Timmerman V, Sevilla T, Cruz-Martinez A, Martinez F, Millan JM, Arpa J, Vilchez JJ, Prieto F, Van Broeckhoven C and Palau F. (1997) Mutational analysis of the MPZ, PMP22 and Cx32 genes in patients of Spanish ancestry with Charcot-Marie-Tooth disease and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum Genet*, **99**, 746-754.
- Bouhouche A, Benomar A, Birouk N, et al. (1999). A locus for an axonal form of autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease maps to chromosome 1q21.2-q21.3. *Am. J. Hum. Genet*, **65**: 722-727.
- Bouhouche A, Benomar A, Birouk N, et al. (2003). High incidence of SMN1 gene deletion in Moroccan adult-onset spinal muscular atrophy patients. *J Neurol*, **250** (1209-1213).
- Bouhouche A, Birouk N, Azzedine H, Benomar A, Durosier G, Ente D, Muriel MP, Ruberg M, Slassi I, Yahyaoui M, Dubourg O, Ouazzani R, LeGuern E (2007). Autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease (ARCMT2): phenotype-genotype correlations in 13 Moroccan families. *Brain*, **130**(Pt 4):1062-75.
- Brust JCM, Lovelace RE, and Devi S.(1978). Clinical and electrodiagnostic features of Charcot-Marie-Tooth syndrome. *Acta Neurol Scand* **58**: 1-42.
- Callen E, Casado JA, Tischkowitz MD *et al.* (2005). A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood*, **105** (5): 1946-1949.
- Capasso M., Di Muzio A, Ferrarini M, et al. (2004). Internerves and intra-nerve conduction heterogeneity in CMTX with Arg(15)Gln mutation. *Clin. Neurophysiol*, **115**: 64-70.

- Carra S, Sivilotti M, Chavez Zobel AT, Lambert H, and Landry J. (2005). HspB8, a small heat shock protein mutated in human neuromuscular disorders, has in vivo chaperone activity in cultured cells. *Hum. Mol. Genet*, **14**: 1659-1669.
- Charcot JM, Marie P. (1886). Sur une forme peculière d'atrophie musculaire progressive, souvent familiale, débutant par les pès et jambes et atteignant plus tard les mains. *Rev Méd (Paris)*, **6**: 97-138.
- Chen H. and Chan DC. (2004). Mitochondrial dynamics in mammals. *Curr Top Dev Biol*, **59**: 119-144.
- Chandross KJ, Kessler JA, Cohen RI, et al. (1996). Altered connexin expression after peripheral nerve injury. *Mol Cell Neurosci*, **7**: 501-518.
- Chow, C. Y.; Zhang, Y.; Dowling, J. J.; Jin, N.; Adamska, M.; Shiga, K.; Szigeti, K.; Shy, M. E.; Li, J.; Zhang, X.; Lupski, J. R.; Weisman, L. S.; Meisler, M. H. (2007). Mutation of FIG4 causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J. *Nature* **448**: 68-72.
- Chung KW, Kim SB, Park KD, Choi KG, Lee JH, Eun HW, Suh JS, Hwang JH, Kim WK, Seo BC, Kim SH, Son IH, Kim SM, Sunwoo IN, Choi BO (2006). Early onset severe and late-onset mild Charcot-Marie-Tooth disease with mitofusin 2 (MFN2) mutations. *Brain*, **129**:2103-18
- Chung KW, Kim SM, Sunwoo IN, Cho SY, Hwang SJ, Kim J, Kang SH, Park KD, Choi KG, Choi IS, Choi BO (2008). A novel GDAP1 Q218E mutation in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *J Hum Genet*, **53**(4):360-4.
- Claramunt R, Pedrola L, Sevilla T, et al. (2005). Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J. Med. Genet*, **42**: 358-365.
- Claramunt R, Sevilla T, Lupo V, Cuesta A, Milla'n JM, Vélchez JJ, Palau F, Espinós C. (2007). The p.R1109X mutation in SH3TC2 gene is predominant in Spanish Gypsies with Charcot-Marie-Tooth disease type 4. *Clin Genet*, **71**: 343-349.
- Combarros O, Calleja J, Polo JM, Berciano J. (1987). Prevalence of Hereditary motor and sensory neuropathy in Cantabria. *Acta neurol Scand*, **75**: 9-12.
- Cowchock F. S., Duckett S. W., Streletz L. J., Graziani L. J., Jackson, L. G. (1985). X-linked motor-sensory neuropathy type-II with deafness and mental retardation: a new disorder. *Am. J. Med. Genet*. **20**: 307-315.
- Cuesta A, Pedrola L, Sevilla T, et al. (2002). The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet*, **30**: 22-25.
- Dang H, Li Z, Skolnik EY, and Fares H. (2004). Disease-related myotubularins function in endocytic traffic in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell*, **15**: 189-196.

- Davidenkow S. (1927) Über die neurotische muskulatrophie Charcot-Marie. *Klinisch-genetische Studien. Z Ges Neurol Psychiat.*, **107**, 259-320.
- Davis CJF, Bradley WG, and Madrid R. (1978). The peroneal muscular atrophy syndrome. Clinical, genetic, electrophysiological and nerve biopsy studies. Part 1 (Clinical, genetic and electrophysiological findings). *J Genet. Hum* **26**: 311–349
- De Jonghe P, Timmerman V, Nelis E, Martin JJ, Van Broekhoven C. (1997). Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies. *J Periph Nerv Syst*, **2**: 380-387.
- De Jonghe P, Timmerman V, Ceuterick C, *et al.* (1999). The Thr124Met mutation in the peripheral myelin protein zero (MPZ) gene is associated with a clinically distinct Charcot-Marie-Tooth phenotype. *Brain*, **122**: 281-290.
- De Jonghe P, Mersivanova I, Nelis E, *et al.* (2001). Further evidence that neurofilament light chain gene mutations can cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2E. *Ann. Neurol*, **49** (2): 245-249.
- De Sandre-Giovannoli A, Chaouch M, Kozlov S, *et al.* (2002). Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am. J. Hum. Genet*, **70**: 726-736.
- De Sandre-Giovannoli A, Delague V, Hamadouche T, *et al.* (2005). Homozygosity mapping of autosomal recessive demyelinating Charcot-Marie-Tooth neuropathy (CMT4H) to a novel locus on chromosome 12p11.21-q13.11. *J Med. Genet.* **42**: 260-265.
- Delague V, Bareil C, Tuffery S, Bouvagnet P, Chouery E, Koussa S, Maisonneuve T, Loiselet J, Megarbane A and Claustres M. (2000). Mapping of a new locus for autosomal recessive demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease to 19q13.1–13.3 in a large consanguineous Lebanese family: exclusion of MAG as a candidate gene. *Am J Hum Genet*, **67**: 236-243.
- Delague, V.; Jacquier, A.; Hamadouche, T.; Poitelon, Y.; Baudot, C.; Boccaccio, I.; Chouery, E.; Chaouch, M.; Kassouri, N.; Jabbour, R.; Grid, D.; Megarbane, A.; Haase, G.; Levy, N. (2007) Mutations in FGD4 encoding the Rho GDP/GTP exchange factor frabin cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4H. *Am. J. Hum. Genet.* **81**: 1-16.
- Delague V, Jacquier A, Hamadouche T, Poitelon Y, Baudot C, Boccaccio I, Chouery E, Chaouch M, Kassouri N, Jabbour R, Grid D, Mégarbané A, Haase G, Lévy N (2007). Mutations in FGD4 encoding the Rho GDP/GTP exchange factor FRABIN cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4H. *Am J Hum Genet*, **81**(1):1-16.
- Dejerine J, Sottas J. (1893). Sur la névrite interstitielle, hypertrophique et progressive de l'enfance. Affection souvent familiale et a debut infantile, caracterisée par atrophie musculaire des extremités avec troubles marqués de la sensibilité et ataxie des mouvements et revelant d'une névrite interstitielle hypertrophique à marche ascendente avec lésions medullaires associées. *CR Soc Biol (Paris)* **45**: 63-96.

- Desviat LR, Perez B, Ugarte M. (1997). Phenylketonuria in Spanish Gypsies: prevalence of the IVS10nt546 mutation on haplotype 34. *Hum Mutat*; 9 (1): 66–68.
- Di Maria E, Gulli R, Balestra P, *et al.* (2004). A novel mutation of GDAP1 associated with Charcot-Marie-Tooth disease in three Italian families: evidence for a founder effect. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **75**: 1495–1498.
- Dubourg O, Tardieu S, Birouk N, *et al.* (2001). The frequency of 17p12 duplication and Connexin 32 mutations in 282 CMT families in relation to the mode of inheritance and motor nerve conduction velocity. *Neuromuscul Disord*, **11**: 458-463.
- Dyck PJ. (1975). Inherited neuronal degeneration and atrophy affecting peripheral motor, sensory, and autonomic neurons. *En: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, eds. Peripheral neuropathy. Philadelphia: WB Saunders. Co: 825-867.*
- Dyck PJ, C. P., Lebo R, Carney JA, *et al* (1993). Hereditary motor and sensory neuropathies, in *Peripheral neuropathy*. 1094-1136.
- Dyck PJ, Lambert, E (1968a). Lower motor and primary sensory neuron disease with peroneal muscular atrophy I. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in hereditary polineuropathies. *Arch neurol* **18**: 603-618.
- Dyck PJ, Lambert, E., (1968b). Lower motor and primary sensory neuron disease with peroneal muscular atrophy II. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in various neuronal degenerations. *Arch Neurol* **18**: 619-625.
- Dytrych L, Sherman D, Gillespie CS, Brophy PJ. (1998). Two PDZ domain proteins encoded by the murine periaxin gene are the result of alternative intron retention and are differentially targeted in Schwann cells. *J Biol Chem*, **273** (10): 5494-800.
- Evgrafov OV, Mersiyanova I, Irobi J, *et al.* (2004). Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nat. Genet*, **36**: 602-606.
- Fain PR, Barker DF, and Chance PF. (1994). Refined genetic mapping of X-linked Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Am. J. Hum. Genet*, **54**: 229-235.
- Farrall, M. (1993) Homozygosity mapping: familiarity breeds debility. *Nat Genet*, **5**, 107-108.
- Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, *et al.* (1999). Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med*, **341**: 17175-1724.
- Feng Y, Press B, and Wandinger-Ness A. (1995). Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol*, **131**: 1435-1452.
- Filbin MT, Zhang K., Li W, Gao Y. (1999). Characterization of the effect on adhesion of different mutations in myelin P0 protein. *Ann N Y Acad Sci*, **883**: 160-167.

- Fischbeck K. H., ar-Rushdi N., Pericak-Vance M., Rozear M., Roses A. D., Fryns J. P. (1986). X-linked neuropathy: gene localization with DNA probes. *Ann. Neurol.* **20**: 527-532.
- Fischbeck K. H., Ritter A., Shi Y., Nussbaum R. W., Lesko J., Ionasescu V., Chance P., Harding A. (1987) Linkage studies of X-linked neuropathy and spinal muscular atrophy. (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet.* **46**: 614 only.
- Fraser A. (1992). The Gypsies. *Blackwell Publishers, Oxford Hancock I.*
- Gabreëls-Festen AA., Joosten EM., Gabreëls FJ, Jennekens FG, Gooskens RH and Stegeman DF. (1991). Hereditary motor and sensory neuropathy of neuronal type with onset in early childhood. *Brain*, **114 (Part 4)**: 1855–1870.
- Gabreëls-Festen A, van Beersun BS, Eshuis L, *et al.* (1999). Study on the gene and phenotypic characterisation of autosomal recessive demyelinating motor and sensory neuropathy (Charcot-Marie-Tooth disease) with a gene locus on chromosome 5q23-q33. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **66**: 569-574.
- Garcia CA. (1999). A clinical review of Charcot-Marie-Tooth. *Ann N Y Acad Sci*, **883**: 69-76.
- Gemignani F. and Marbini A. (2001). Charcot-Marie-Tooth disease (CMT): distinctive phenotypic and genotypic features in CMT type 2. *J Neurol Sci*, **184**: 1-9.
- Gillespie CS, Sherman DL, Blair GE, and Brophy PJ. (1994). Periaxin, a novel protein of myelinating Schwann cells with a possible role in axonal ensheathment. *Neuron*, **12**: 497-508.
- Gilliatt RW, Thomas PK. (1957). Extreme slowing of nerve conduction in peroneal muscular atrophy. *Ann Phys Med.* **4** (3): 104-6.
- Gooding R, Colomer J, King R *et al.* (2005). A novel Gypsy founder mutation, p.Arg1109X in the CMT4C gene, causes variable peripheral neuropathy phenotypes. *J Med Genet*, **42**(12): e69.
- Gresham D, Morar B, Underhill PA *et al.* (2001). Origins and divergence of the Roma (gypsies). *Am J Hum Genet*: **69** (6): 1314–1331.
- Gruenbaum Y, Margalit A, Goldman RD., Shumaker DK, and Wilson KL. (2005). The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**: 21-31.
- Guilbot A, Ravise N, Bouhouche A, Coullin P, Birouk N, Maissonobe T, Kuntzer T, Vial C, Grid D, Brice A, LeGuern E. (1999). Genetic, cytogenetic and physical refinement of the autosomal recessive CMT linked to 5q31-q33. *Eur J Hum Genet*, **7**: 849-859.
- Guilbot A, Williams A, Ravise N, *et al.* (2001). A mutation in periaxin is responsible for CMT4F, an autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mol Genet*, **10**: 415-421.
- Haites N, Fairweather N. Clark C, Kelly KF, Simpson S and Johnston AW. (1989). Linkage in a family with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Clin Genet*, **35**, 399-403.

- Hantke J, R. T., French L, Tournev I, Guergueltcheva V, Urtizbera JA, Colomer J, Corches A, Lupu C, Merlini L, Thomas PK, Kalaydjieva L. (2003). Refined mapping of the HMSNR critical gene region-construction of a high-density integrated genetic and physical map. *Neuromuscul Disord*, **13** (9): 729-36.
- Harding AE, Thomas P. K. (1980). The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain*, **103**: 259-280.
- Hayasaka K, Himoro M, Sato W, et al. (1993a). Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P0 gene. *Nat Genet*, **5** (1): 31-34.
- Hayasaka K, Himoro M, Sawaishi Y, et al. (1993b). De novo mutation of the myelin P0 gene in Dejerine-Sottas disease (hereditary motor and sensory neuropathy type III). *Nat Genet*, **5** (3): 266-268.
- Holmberg BH, (1993). Charcot-Marie-Tooth disease in northern Sweden: an epidemiological and clinical study. *Acta Neurol Scand*, **87**(5): 416-22.
- Houlden H, King RH, Muddle JR, et al. (2004). A novel RAB7 mutation associated with ulceromutilating neuropathy. *Ann Neurol*, **56**: 586-590.
- Humberstone PM. (1972). Nerve conduction studies in Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Neurol.Scand*, **48**: 176-190.
- Hunter M, Bernard R, Freitas E, et al. (2003). Mutation screening of the N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1) in patients with Charcot-Marie-Tooth Disease. *Hum Mutat*, **22**: 129-135.
- Huttner, I. G., Kennerson M. L., Reddel S. W., Radovanovic D., Nicholson G. A., (2006). Proof of genetic heterogeneity in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* **67**: 2016-2021.
- Ionasescu VV, Trofatter J, Haines JL, Summers AM, Ionasescu R, Searby C. (1991). Heterogeneity in X-linked recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Am. J Hum Genet*, **48**: 1075-1083.
- Ionasescu VV, Trofatter J, Haines JL, Summers AM, Ioanescu R and Searby C. (1992). X-linked recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy—clinical and genetic study. *Muscle Nerve*, **15**: 368-373.
- Irobi J, Van Impe K, Seeman P, et al. (2004). Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy. *Nat. Genet*, **36**: 597-601.
- Jordanova A, De Jonghe P, Boerkoel CF, et al. (2003). Mutations in the neurofilament light chain gene (NEFL) cause early onset severe Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain*, **126**: 590-597.
- Jordanova A, Thomas FP, Guergueltcheva V, et al. (2003b). Dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth type C maps to chromosome 1p34-p35. *Am. J Hum Genet*, **73**: 1423–1430.
- Jordanova A., Thomas F. P., Guergueltcheva V., Tournev I., Gondim F. A. A., Ishpekova B., De Vriendt E., Jacobs A., Litvinenko I., Ivanova N., Buzhov B., De Jonghe P., Kremensky I., Timmerman V. (2006) Dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth type C maps to chromosome 1p34-p35. *Am. J. Hum. Genet.* **73**: 1423-1430

- Kalanin J, Takarada Y, Kagawa S, Yamashita K, Ohtsuka N, Matsuoka A. (1994) Gypsy phenylketonuria: a point mutation of the phenylalanine hydroxylase gene in Gypsy families from Slovakia. *Am J Med Genet*: **49** (2):235–239.
- Kalaydjieva L, Hallmayer J, Chandler D, *et al.* (1996). Gene mapping in Gypsies identifies a novel demyelinating neuropathy on chromosome 8q24. *Nat Genet*, **14**: 214-217.
- Kalaydjieva L, Gresham D, Gooding R, Heather L, Baas F, De Jonghe R, Blechschmidt K, Angelicheva D, Chandler D, Worsley P, Rosenthal A, King RH and Thomas PK. (2000). N-myc downstream-regulated gene 1 is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy-Lom. *Am J Hum Genet*, **67**, 47-58.
- Kalaydjieva L, Morar B, Gresham D, *et al.* (2001). Social and biological history on the Roma (Gypsies). *Acta Myol*, **20**: 181-187.
- Kalaydjieva L, M. B., Chaix R, Tang H. (2005). A newly discovered founder population: the Roma/Gypsies. *Bioessays*, **27** (10): 1084-94.
- Kessali M, Zemmouri R, Guilbot A, *et al.* (1997). A clinical, electrophysiologic, neuropathologic, and genetic study of two large Algerian families with an autosomal recessive demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology*, **48**: 867–873.
- Kijima K, Numakura C, Izumino H, *et al.* (2005). Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Hum Genet*, **116**: 23-27.
- Klein CJ, Cunningham JM, Atkinson EJ, *et al.* (2003). The gene for HMSN2C maps to 12q23-24: a region of neuromuscular disorders. *Neurology*, **60**: 1151-1156.
- Kunkel LM, Tantravahi U, Eisenhard M and Latt S.A. (1982) Regional localization on the human X of DNA segments cloned from flow sorted chromosomes. *Nucleic Acids Res*, **10**, 1557-1578.
- Kurihara S, Adachi Y, Wada K, *et al.* (2002). An epidemiological study of Charcot-Marie-Tooth disease in Western Japan. *Neuroepidemiology*, **21**: 246-250.
- Laporte J, Hu LJ, Kretz C, Mandel JL, Kioschis P, Coy JF, Klauck SM, Poustka A, Dahl N (1996). A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat Genet*, **13** (2): 175-82.
- Lariviere RC, Julien JP. (2004). Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol*, **58** (1): 131-48.
- Lathrop GM and Lalouel JM. (1984). Easy calculations of lod scores and genetic risks on small computers. *Am J Hum Genet*, **36**, 460-465.
- Lawson VH, Graham BV, and Flanigan KM. (2005). Clinical and electrophysiologic features of CMT2A with mutations in the mitofusin 2 gene. *Neurology* **65**: 197-204.

- Le N, Nagarajan R, Wang JY, Araki T, Schmidt RE, Milbrandt J. (2005). Analysis of congenital hypomyelinating Egr2Lo/Lo nerves identifies Sox2 as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102** (7): 2596-601.
- Leal A, Morera B, Del Valle G, et al. (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.
- Leblanc SE, Srinivasan R, Ferri C, Mager GM, Gillian-Daniel AL, Wrabetz L, Svaren J. (2005a). Regulation of cholesterol/lipid biosynthetic genes by Egr2/Krox20 during peripheral nerve myelination. *J Neurochem*, **93** (3): 737-48.
- Le Guern E, Ravise N, Gugenheim M, et al. (1994). Linkage analyses between dominant X-linked Charcot-Marie-Tooth disease, and 15 Xq11-Xq21 microsatellites in a new large family: three new markers are closely linked to the gene. *Neuromusc Disord*, **4**: 463-469.
- LeGuern E, Guilbot A, Kessali M, et al. (1996). Homozygosity mapping of an autosomal recessive form of demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 5q23-q33. *Hum Mol Genet*, **5**: 1685-1688.
- Liu B, Wang J, Chan K. M, et al. (2005). Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat Med*, **11**: 780-785.
- Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S. (1991). DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A. *Cell*, **66**: 219-32.
- Lupski, J.R. (1992). An inherited DNA rearrangement and gene dosage effect are responsible for the most common autosomal dominant peripheral neuropathy: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Clin Res*, **40**, 645-652.
- Lupski-JR, Garcia CA. (2000). Charcot-Marie-Tooth peripheral neuropathies and related disorders. *The metabolic and molecular basis of inherited diseases*: 5559-5788.
- Madrid R, Bradley WG and Davis CJ. (1977). The peroneal muscular atrophy syndrome. Clinical, genetic, electrophysiological and nerve biopsy studies. Part 2. Observations on pathological changes in sural nerve biopsies. *J Neurol Sci*, **32**: 91-122.
- Marco A, Cuesta A, Pedrola L, Palau F and Marin I. (2004). Evolutionary and structural analyses of GDAP1, involved in Charcot-Marie-Tooth disease, characterize a novel class of glutathione transferase-related genes. *Mol Biol Evol*, **21**: 176-187.
- Martin JJ, Brice A, and Van Broeckhoven C. (1999). 4th Workshop of the European CMT-Consortium—62nd ENMC International Workshop. Rare forms of Charcot-Marie-Tooth disease and related disorders. 16-18 October 1998, Soestduinen, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*, **9**: 279-287.

- Martyn CN and Hughes RAC. (1997). Epidemiology of peripheral neuropathy. *J Neurol Neurosur. Psychiatry*, **62**: 310-318.
- Matsunami N, Smith B, Ballard L, *et al.* (1992). Peripheral myelin protein-22 gene maps in the duplication in chromosome 17p12 associated with Charcot-Marie-Tooth 1A. *Nat Genet*, **1**: 176-179.
- Meier C, Dermietzel R, Davidson KG, Yasumura T and Rash JE. (2004). Connexin 32-containing gap junctions in Schwann cells at the internodal zone of partial myelin compaction and in Schmidt-Lanterman incisures. *J Neurosci*, **24**: 3186-3198.
- Meresse S, Gorvel JP, and Chavrier P. (1995). The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes. *J Cell Sci*, **108**: 3349-3358.
- Merlini L, Villanova M., Sabatelli P, Trogu A, Malandrini A, Yanakiev P, Maraldi NM, Kalaydjieva L. (1998). Hereditary motor and sensory neuropathy Lom type in an Italian Gypsy family. *Neuromuscul Disord*, **8** (3-4): 182-5.
- Mersyanova IV, Ismailov SM, Polyakov AV, *et al.* (2000). Screening for mutations in the peripheral myelin genes PMP22, MPZ and Cx32 (GJB1) in Russian Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients. *Hum Mutat*, **15**: 340-347.
- Mersyanova IV, Perepelov AV, Polyakov AV, *et al.* (2000). A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene. *Am. J. Hum. Genet*, **67**: 37-46.
- Monros, E., Smeyers, P., Rodius, F., Canizares, J., Molto, M.D., Vilchez, J.J., Pandolfo, M., Lopez-Arlandis, J., de Frutos, R., Prieto, F. and *et al.* (1994) Mapping of Friedreich's ataxia locus by identification of recombination events in patients homozygous by descent. *Eur J Hum Genet*, **2**, 291-299.
- Monros E, Canizares J, Molto MD, Rodius F, Montermini L, Cossee M, Martinez F Prieto, de Frutos R, Koenig M, Pandolfo M, Bertranpetit J. and Palau F. (1996) Evidence for a common origin of most Friedreich ataxia chromosomes in the Spanish population. *Eur J Hum Genet*, **4**, 191-198.
- Morar B, Gresham D., Angelicheva D, Tournev I, Gooding R, Guergueltcheva V, Schmidt C, Abicht A, Lochmuller H, Tordai A, Kalmar L, Nagy M, Karcagi V, Jeanpierre M, Herczegfalvi A, Beeson D, Venkataraman V, Warwick Carter K, Reeve J, de Pablo R, Kucinskas V, Kalaydjieva L. (2004). Mutation history of the roma/gypsies. *Am J Hum Genet*, **75** (4): 596-609.
- Moriwaki Y, Begum NA, Kobayashi M, Matsumoto M, Toyoshima K and Seya T. (2001). Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin and its cell wall complex induce a novel lysosomal membrane protein, SIMPLE, that bridges the missing link between lipopolysaccharide and p53-inducible gene, LITAF(PIG7), and estrogen-inducible gene, EET-1. *J Biol Chem*, **276**: 23065-23076.

- Morocutti C, Colazza G., Soldati G, *et al.* (2002). Charcot-Marie-Tooth disease in Molise, a Central Southern region of Italy: an epidemiological study. *Neuroepidemiology*, **21**: 241-245.
- Mostacciolo ML, Muller E., Fardin P, *et al.* (1991). X-linked Charcot-Marie-Tooth disease: a linkage study in a large family by using 12 probes for the pericentromeric region. *Hum. Genet*, **87**: 23-27.
- Mostacciolo ML, Righetti E, Zortea M, *et al.* (2001). Charcot-Marie-Tooth disease type I and related demyelinating neuropathies: Mutation analysis in a large cohort of Italian families. *Hum Mutat*, **18**: 32-41.
- Muchir A, Bonne G, van der Kooi AJ, *et al.* (2000). Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet*, **9**: 1453-1459.
- Naef R and Suter U. (1999). Impaired intracellular trafficking is a common disease mechanism of PMP22 point mutations in peripheral neuropathies. *Neurobiol Dis*, **1**: 1-14.
- Nafe R, Trollmann R and Schlote W. (2001). The giant axonal neuropathy—clinical and histological aspects, differential diagnosis and a new case. *Clin Neuropathol*, **20**: 200-211.
- Nagarajan R, Svaren J., Le N, Araki T, Watson M, Milbrandt J. (2001). EGR2 mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression. *Neuron*, **30** (2): 355-68.
- Navarro C, Teijeira S. (2003). Neuromuscular disorders in the Gypsy ethnic group. *Acta Myol*, **22**: 11-14.
- Namekawa M, Nelson I, Ribai P *et al.* (2006). A founder effect and mutational hot spots may contribute to the most frequent mutations in the SPG3A gene. *Neurogenetics*, **7**(2):131–132.
- Nelis E, Van Broeckhoven C, De Jonghe P, *et al.* (1996). Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a European collaborative study. *Eur J Hum Genet*, **4** (1): 25-33.
- Nelis E, Irobi J, De Vriendt E, Van Gerwen V, Perez Novo C, *et al.* (2001). Homozygosity mapping of families with recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathies. *Acta Myol*, **20**: 39-42.
- Nelis E, Erdem S, Van Den Bergh PY, *et al.* (2002). Mutations in GDAP1: autosomal recessive CMT with demyelination and axonopathy. *Neurology*, **59**: 1865-1872.
- Nelis E, Berciano J, Verpoorten N, *et al.* (2004). Autosomal dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2G) maps to chromosome 12q12-q13.3. *J Med Genet*, **41**: 193-197.
- Niemann A, Ruegg M, La Padula V, Schenone A, Suter U (2005). Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol*, **170** (7): 1067-1078.

- Numakura C, Lin C, Ikegami T, Guldberg P and Hayasaka K. (2002). Molecular analysis in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease: DGGE analysis for PMP22, MPZ, and Cx32/GJB1 mutations. *Hum Mutat*, **20**: 392-398.
- Numakura C, Shirahahta E, Yamashita S, et al. (2003). Screening of the early growth response 2 gene in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *J. Neurol Sci*, **15**: 61-64.
- Okuda T, Higashi Y, Kokame K., Tanaka C, Kondoh H, and Miyata T. (2004). Ndr1-deficient mice exhibit a progressive demyelinating disorder of peripheral nerves. *Mol Cell Biol*, **24**: 3949-3956.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K and Sekiya T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2766-2770.
- Othmane KB, Johnson E, Menold M, et al. (1999). Identification of a new locus for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease with focally folded myelin on chromosome 11p15. *Genomics*, **62**: 344-349.
- Ott J. (1974) Estimation of the recombination fraction in human pedigrees: efficient computation of the likelihood for human linkage studies. *Am J Hum Genet*, **26**, 588-597.
- Ott J. (1985) A chi-square test to distinguish allelic association from other causes of phenotypic association between two loci. *Genet Epidemiol*, **2**, 79-84.
- Ouvrier RA, McLeod JG, Morgan GJ, Wise GA and Conchin TE. (1981). Hereditary motor and sensory neuropathy of neuronal type with onset in early childhood. *J Neurol Sci*, **51**: 181-197.
- Palau F, Cuesta Peredo A and Pedrola Vidal L. (2002) [Advances in the molecular genetics of the hereditary neuropathies]. *Rev Neurol*, **35**, 246-253.
- Parkinson DB, Bhaskaran A, Droggiti A, Dickinson S, D'Antonio M, Mirsky R, Jessen KR. (2004). Krox-20 inhibits Jun-NH2-terminal kinase/c-Jun to control Schwann cell proliferation and death. *J Cell Biol*, **164** (3): 385-94.
- Pedrola L, Espert A, Wu X, Claramunt R, Shy ME and Palau F. (2005). GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum. Mol Genet*, **14**: 1087-1094.
- Pedrola L, Espert A, Valdés-Sánchez T, Sánchez-Piris M, Sirkowski EE, Scherer SS, Fariñas I, Palau F (2008). Cell expression of GDAP1 in the nervous system and pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *J Cell Mol Med*. **12**(2):679-89. Epub 2007 Nov 16.
- Perez-Olle R, Lopez-Toledano MA, Goryunov D, et al. (2005). Mutations in the neurofilament light gene linked to Charcot-Marie-Tooth disease cause defects in transport. *J. Neurochem*, **93**: 861-874.
- Preville X, Salvemini F, Giraud S, et al. (1999). Mammalian small stress proteins protect against oxidative stress through their ability to increase glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and by maintaining optimal cellular detoxifying machinery. *Exp Cell Res*, **247**: 61-78.

- Priest J. M., Fischbeck K. H., Nouri N., Keats B. J. B. (1995). A locus for axonal motor-sensory neuropathy with deafness and mental retardation maps to Xq24-q26. *Genomics* **29**: 409-412, 1995.
- Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, De Jorghe P, Hoogendijk LE, Baas F, *et al.* (1991). Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT1a). *Neuromuscul Disord*, **1**: 93-7.
- Raeymaekers P, Timmerman V, De Jonghe P, *et al.* (1989). Localization of the mutation in an extended family with Charcot-Marie-Tooth neuropathy (HMSN I). *Am. J Hum Genet.* **45**(6): 953-958.
- Rautenstrauss B, Leal A, Huehne K, Bauer F, *et al.* (2005a). Positional cloning of the CMT2B2 gene and its implications for CMT1A. Meeting of the Peripheral Nerve Society, Tuscany, Italy. *J. Peripher Nerv Sys* **10** (S1): 77.
- Rautenstrauss B, Leal A, Huehne K, Sticht H, *et al.* (2005b). MED25 transcription activator is mutated in CMT2B2, carries a SH3 recognition motif and is coordinately expressed with Pmp22 in CMT1A animal models. *American Society of Human Genetics, Salt Lake City.*
- Ressot C. and Bruzzone (2000). Connexin channels in Schwann cells and the development of the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain Res. Rev.* **32**: 192-202
- Rober RA, Weber K and Osborn M. (1989). Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. *Development*, **105**: 365-378.
- Rogers T, Chandler D, Angelicheva D, *et al.* (2000). A novel locus for autosomal recessive peripheral neuropathy in the EGR2 region on 10q23. *Am J Hum Genet*, **67**: 664-667.
- Rojo M, Legros F, Chateau D and Lombes A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase. *J Cell Sci*, **115**: 1663-1674.
- Roussy G, Levy G. (1926). Sept cas d'une maladie familiale particulière. *Rev neurol*, **1**:427-450
- Rudnik-Schoneborn S, Goebel HH, Schlote W, *et al.* (2003). Classical infantile spinal muscular atrophy with SMN deficiency causes sensory neuronopathy. *Neurology*, **60**: 983-987.
- Saifi GM, Szigeti K, Wiszniewski W, *et al.* (2005). SIMPLE mutations in Charcot-Marie-Tooth disease and the potential role of its protein product in protein degradation. *Hum Mutat*, **25** (4): 372-373.
- Salisachs P. (1974). Wide spectrum of motor conduction velocity in Charcot-Marie-Tooth disease: an anatomico-physiological interpretation. *J Neurol Sci.* **23**: 25-31
- Schaffer, A.A. (1996). Faster linkage analysis computations for pedigrees with loops or unused alleles. *Hum Hered*, **46**, 226-235.

- Scherer SS, Desche[^]nes SM, Xu Y-T, Grinspan JB, Fischbeck KH and Paul DL. (1995). Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J Neurosci*, **15**: 8281–8294.
- Senderek J, Hermanns B, Hartmann C and Schröder JM. (1999). P0 point mutations in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2: two novel amino acid substitutions (Tyr119Cys; Asp61Gly) and a possible “hot spot” on Thr124. *European Charcot-Marie-Tooth Consortium 8th Annual Symposium, Antwerp, Belgium*.
- Senderek J, B. C., Ramaekers V. T., *et al.* (2003a). Mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 (GDAP1) gene in intermediate type autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain*, **126**: 642-649.
- Senderek J, Bergmann C., Weber S, Ketelsen UP, Schorle H, Rudnik-Schoneborn S, Buttner R, Buchheim E, Zerres K. (2003b). Mutation of the SBF2 gene, encoding a novel member of the myotubularin family, in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 4B2/11p15. *Hum Mol Genet*, **12** (3): 349-56.
- Senderek J, Bergmann C, Stendel C, Kirfel J, Verpoorten N, De Jonghe P, Timmerman V, Chrast R, Verheijen MH, Lemke G, Battaloglu E, Parman Y, Erdem S, Tan E, Topaloglu H, Hahn A, Muller-Felber W, Rizzuto N, Fabrizi GM, Stuhmann M, Rudnik-Schoneborn S, Zuchner S, Michael Schroder J, Buchheim E, Straub V, Klepper J, Huehne K, Rautenstrauss B, Buttner R, Nelis E, Zerres K. (2003c). Mutations in a gene encoding a novel SH3/TPR domain protein cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4C neuropathy. *Am J Hum Genet*, **73** (5): 1106-19.
- Sevilla T, Cuesta A, Chumillas MJ, *et al.* (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.
- Shackleton S, Lloyd DJ, Jackson SN, *et al.* (2000). LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet*, **24**: 153-156.
- Sherman DL, Fabrizi C, Gillespie CS and Brophy PJ. (2001). Specific disruption of a schwann cell dystrophin-related protein complex in a demyelinating neuropathy. *Neuron*, **30**: 677-687.
- Shiba K, Schimmel P, Motegi H and Noda T. (1994). Human glycyl-tRNA synthetase. Wide divergence of primary structure from bacterial counterpart and species-specific aminoacylation. *J Biol Chem*, **269** (30): 49-55.
- Shabo G, Scheffer H, Cruysberg JR, Lammens M, Pasman JW, Spruit M, Willemsen MA (2005). Congenital cataract facial dysmorphism neuropathy syndrome: a clinically recognizable entity. *Pediatr Neurol.*, **33**(4):277-9.
- Silander K, Meretoja P, Juvonen V, *et al.* (1998). Spectrum of mutations in Finnish patients with Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies. *Hum. Mutat*, **12**: 59-68.

- Sladky J. T., Brown M. J. (1984) Infantile axonal polyneuropathy with X-linked inheritance. (Abstract) *Ann. Neurol.* **16**: 402 only.
- Snipes GJ, Suter U., Welcher AA, Shooter EM (1992). Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/SR13). *J Cell Biol*, **1**: 225-238.
- Söhl G, Gillen C, Bosse F, Gleichmann M, Muller HW and Willecke K. (1996). A second alternative transcript of the gap junction gene connexin32 is expressed in murine Schwann cells and modulated in injured sciatic nerve. *Eur J Cell Biol*, **69**: 267-275.
- Skre H. (1974) Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet*, **6**, 98-118.
- Stendel, C.; Roos, A.; Deconinck, T.; Pereira, J.; Castagner, F.; Niemann, A.; Kirschner, J.; Korinthenberg, R.; Ketelsen, U.-P.; Battaloglu, E.; Parman, Y.; Nicholson, G.; and 12 others. (2007). Peripheral nerve demyelination caused by a mutant Rho GTPase guanine nucleotide exchange factor, Frabin/FGD4. *Am. J. Hum. Genet.* **81**: 158-164.
- Stojkovic T, Latour P, Viet G, de Seze J, Hurtevent JF, Vandenberghe A, Vermersch P (2004). Vocal cord and diaphragm paralysis, as clinical features of a French family with autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease, associated with a new mutation in the GDAP1 gene. *Neuromuscul Disord* **14**:261–264.
- Straub BK, Boda J, Kuhn C, Schnoelzer M, Korf U, Kempf T, Spring H, Hatzfeld M, Franke WW. (2003). A novel cell-cell junction system: the cortex adhaerens mosaic of lens fiber cells. *J Cell Sci*, **166** (24): 4985-95.
- Strachan, T. and Read, A.P. (1999) Identificación de genes de enfermedades humanas. In Omega (ed.), *Genética Molecular Humana*, pp. 397-431.
- Street VA, Goldy JD, Golden AS, Tempel BL, Bird TD and Chance PF. (2002). Mapping of Charcot-Marie-Tooth disease type 1C to chromosome 16p identifies a novel locus for demyelinating neuropathies. *Am J Hum Genet.* **70** (1): 244-250.
- Street VA, Bennett CL, Goldy JD, *et al.* (2003). Mutation of a putative protein degradation gene LITAF/SIMPLE in Charcot-Marie-Tooth disease 1C. *Neurology*, **60** (1): 22-26.
- Sullivan T, Escalante-Alcalde D, Bhatt H, *et al.* (1999). Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol*, **147**: 913-920.
- Takashima H, Boerkoel CF, De Jonghe P, *et al.* (2002). Periaxin mutations cause a broad spectrum of demyelinating neuropathies. *Ann Neurol*, **51**: 709-715.
- Tang BS, Luo W, Xia K, *et al.* (2004). A new locus for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2L) maps to chromosome 12q24. *Hum Genet*, **114**: 527-533.
- Tazir M, Azzedine H, Assami S, *et al.* (2004). Phenotypic variability in autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease due to the R298C mutation in lamin A/C. *Brain*, **127**: 154-163.

- Thomas PK, Calne DB and G., S. (1974). Hereditary motor and sensory polyneuropathy (peroneal muscular atrophy). *Ann Hum Genet*, **38**, 111-153.
- Thomas PK, King R, Small JR, Robertson AM (1996). The pathology of Charcot-Marie-Tooth disease and related disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* **22**: 269-284.
- Thomas PK, Kalaydjieva L, Youl B, *et al.* (2001). Hereditary motor and sensory neuropathy-russe:new autosomal recessive neuropathy in Balkan Gypsies. *Ann Neurol*, **50**: 452-457.
- Timmerman V, Nelis E, Van Hul W, *et al.* (1992). The peripheral myelin protein gene PMP-22 is contained within the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. *Nat Genet*, **1**: 171-175.
- Timmerman V, Lupski JR and De Jonghe P (2006). Molecular Genetics, Biology, and Therapy for Inherited Peripheral Neuropathies. *NeuroMolecular Medicin*, **8**: 1-2.
- Topilko P, Schneider-Maunoury S., Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, Babinet C, Charnay P. (1994). Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature*, **371** (6500): 796-9.
- Tooth HH. (1886). The peroneal type of progressive muscular atrophy. *Doctoral Thesis*.
- Tournev I, Kalaydjieva L., Youl B, Ishpekova B, Guerguelcheva V, Kamenov O, Katzarova M, Kamenov Z, Raicheva-Terzieva M, King RH, Romanski K, Petkov R, Schmarov A, Dimitrova G, Popova N, Uzunova M, Milanov S, Petrova J, Petkov Y, Kolarov G, Aneva L, Radeva O, Thomas PK. (1999). Congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome, a novel complex genetic disease in Balkan Gypsies: clinical and electrophysiological observations. *Ann Neurol*, **45** (6): 742-50.
- Valentijn LJ, Baas F, Wolterman RA, *et al.* (1992). Identical point mutations of PMP-22 in Trembler-J mouse and Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet*, **2** (4): 288-291.
- Valentijn LJ, Bolhuis PA, Zorn I, *et al.* (1992). The peripheral myelin gene PMP-22/GAS-3 is duplicated in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet*, **1**: 166-170.
- Vallat JM, Grid D, Magdelaine C, Sturtz F and Tazir M. (2004). Autosomal recessive forms of Charcot-Marie-Tooth disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*, **4**: 413-419.
- Vallat JM, Tazir M, Magdelaine C, Sturtz F and Grid D. (2005). Autosomal-recessive Charcot-Marie-Tooth diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*, **64**: 363-370.
- Valls Solé J, Casademont PJ, Berciano Blanco J. (2000). Enfermedades de los nervios periféricos." *In Rozman C, ed. Medicina interna Farreras/Rozman. 14ed.*: 1753-70.
- Vance JM, Nicholson GA, Yamaoka LH, *et al.* (1989). Linkage of Charcot-Marie-Tooth neuropathy type1A to chromosome 17. *Exp. Neurol*, **104** (2): 186-189.

- Vance JM, Speer MC, Stajich JM, *et al.* (1996). Misclassification and linkage of hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1 as Charcot-Marie-Tooth disease, type 2B. *Am. J. Hum. Genet*, **59**: 258-260.
- Vance JM. (2000). The many faces of Charcot-Marie-Tooth disease. *Arch neurol*, **57**: 638-640.
- Varon R, Gooding R, Steglich C, *et al.* (2003). Partial deficiency of the C-terminal-domain phosphatase of RNA polimerase II is associated with congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome. *Nat Genet*, **35**: 185-89.
- Verhoeven K, Villanova M, Rossi A, Malandrini A, Timmerman V. and De Jonghe P. (2001). Localization of the gene for the intermediate form of Charcot-Marie-Tooth to chromosome 10q24.1-q25.1. *Am J Hum Genet*, **69**: 889-894.
- Verhoeven K, De Jonghe P, Coen K, *et al.* (2003). Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy. *Am J Hum Genet*, **72**: 722-727.
- Villanova M, Timmerman V, De Jonghe P, *et al.* (1998). Charcot-Marie-Tooth disease: an intermediate form. *Neuromusc. Disord*, **8**: 392-393.
- Warner L. E., Mancias P., Butler I. J., *et al.* (1998). "Mutations in the early growth response 2 gene (EGR2) are associated with hereditary myelinopathies." *Nat. Genet*, **18** (4): 382-384.
- Warner LE, Garcia CA, Lupski JR. (1999). Hereditary peripheral neuropathies: clinical forms, genetics and molecular mechanisms. *Ann Rev Med*, **50**: 263-75.
- Warner LE, Svaren J, Milbrandt J and Lupski JR. (1999). Functional consequences of mutations in the early growth response 2 gene (EGR2) correlate with severity of human myelinopathies. *Hum Mol Genet*, **8**: 1245-1251.
- Wishart MJ and Dixon JE. (2002). PTEN and myotubularin phosphatases: from 3-phosphoinositide dephosphorylation to disease. *Trends Cell Biol*, **12**: 579-585.
- Yoshihara T, Kanda F, Yamamoto M, *et al.* (2001). Novel missense mutation in the early growth response 2 gene associated with late-onset Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *J Neurol Sci*, **184**: 149-153.
- Zastrow MS, Vlcek S and Wilson KL. (2004). Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues. *J Cell Sci*, **117**: 979-987.
- Zhang Y., Zolov S. N., Chow C. Y., Slutsky S. G., Richardson S. C., Piper R. C., Yang B., Nau, J. J., Westrick R. J., Morrison S. J., Meisler M. H., Weisman L. S. (2007). Loss of Vac14, a regulator of the signaling lipid phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate, results in neurodegeneration in mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **104**: 17518-1752.
- Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, *et al.* (2004a). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet*, **36**: 449-451.

Bibliografia

Zuchner S, Noureddine M, Kennerson M, *et al.* (2005). Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nature Genet*, **37**: 289-294.