

11262
23

A



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**"ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN PMP22 EN CHARCOT
MARIE TOOTH TIPO 1A EN PACIENTES MEXICANOS"**

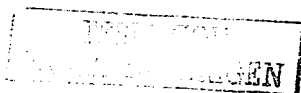
La Dirección General de Bibliotecas
tiene a difundir en formato electrónico e imp.
intenido de mi trabajo recien:
NOMBRE: Norberto Leyva
García
FECHA: 07/03/2003
FIRMA: [Firma]

TESIS DE POSGRADO
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS
P R E S E N T A:
NORBERTO LEYVA GARCIA

ASESOR:
DR. SERGIO A. CUEVAS COVARRUBIAS

MÉXICO, D.F.

2003





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

B

ANALISIS MOLECULAR DEL GEN PMP22 EN CHARCOT MARIE TOOTH
TIPO 1A EN PACIENTES MEXICANOS.

ALUMNO:

Norberto Leyva García

TUTOR DE TESIS:

Dr. en C. Sergio A. Cuevas Covarrubias.

TESIS COMPLETADA
FEB 1998
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

C



**COORDINACIÓN DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité Académico de las Ciencias Médicas, del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, según acuerdo AA7(CM/SCA/SO/32/02) acordó designar y se formaliza por el Comité Académico del Programa, el jurado para el examen de grado de Maestro en Ciencias, (Plan 4006) del C. Norberto Leyva García, quien defenderá la tesis denominada "Análisis molecular del gen PMP22 en Charcot Marie Tooth tipo 1A en pacientes mexicanos"

PRESIDENTE	DRA. SUSANA HELENA KOFMAN-EPSTEIN
SECRETARIO	DRA. MARÍA ELISA ALONSO VILATELA
VOCAL	DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS
SUPLENTE	DRA. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI
SUPLENTE	DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ

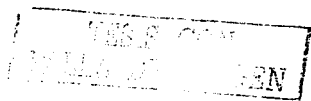
Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria D. F., a 6 de noviembre de 2002.

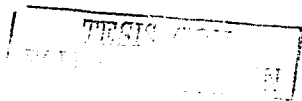
DR. LUIS FELIPE ABREU H.
El Coordinador

NOTA: Por acuerdo del Subcomité Académico, la formalización de este Jurado de Examen de Grado, tiene una vigencia de 6 (seis) meses a partir de la fecha de aprobación del mismo. Excedido el tiempo, el alumno deberá someter a consideración del Subcomité Académico una nueva propuesta de jurado

LFAM/SGT/MOMK

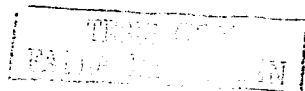


INDICE:	PAGINA.
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ANTECEDENTES	6
JUSTIFICACION	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
OBJETIVO	18
MATERIAL Y METODOS	18
PROCEDIMIENTOS	19
RESULTADOS	23
DISCUSION	29
ANEXOS	32
BIBLIOGRAFIA	33
AGRADECIMIENTOS	44



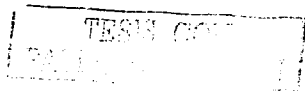
RESUMEN

Las neuropatías hereditarias motoras-sensoriales o enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), representan un grupo clínica y genéticamente heterogéneo de enfermedades que afectan los nervios periféricos. Midiendo las velocidades de conducción motora (VCM), se pueden distinguir dos tipos principales: CMT1 y CMT2. CMT1 es una neuropatía desmielinizante caracterizada por disminución de las VCM (<40 m/s) su patrón de herencia es autosómico dominante. CMT2 es una neuropatía axonal con VCM normales y también se hereda en forma autosómica dominante. Clínicamente se caracterizan por atrofia y debilidad muscular de la porción distal de piernas, provocando pie cavo-varo bilateral. Se han distinguido varios subtipos de CMT1 y CMT2 dependiendo del defecto génico. CMT1A se debe en 70-90% de los casos a la duplicación del gen PMP22, mientras que 10-30% presentan mutaciones puntuales. El gen PMP22 se ubica en una región de 1.5 megabases en 17p11.2-p12 y codifica para una proteína de 22KDa que se expresa en el nervio periférico. El objetivo del presente trabajo es identificar las alteraciones moleculares del gen PMP22 en CMT1A en una muestra de pacientes mexicanos. Se analizaron 12 familias, 7 de presentación esporádica y 5 familiar. Se observó duplicación en tres de los casos índice estudiados mediante el análisis de FISH, lo que corresponde a 25% de los 12 casos analizados, los tres presentaban una disminución de las vcm por debajo de 20m/s y manifestaban una afección clínica grave, incluso un paciente presentó fenotipo Dejerine-Sottas. Por otra parte se detectaron 3 mutaciones silenciosas en base al estudio de secuenciación de PMP22 los cuales no habían sido reportados previamente. Los 3 pacientes eran femeninos y presentaban manifestaciones clínicas menos graves, con vcm de 24 m/s en promedio. Los resultados sugieren la importancia de realizar este tipo de estudios en un mayor número de pacientes incluyendo el análisis de otros genes relacionados con la mielinización para un diagnóstico molecular correcto y asesoramiento genético adecuado.



ABSTRACT.

The hereditary motor and sensory neuropathy or Charcot Marie Tooth disease, represent a clinical and genetically heterogeneous group of illnesses that affect the peripheral nerve. Measuring the motor nerve conduction velocity (MNCV), can be distinguished two main types: CMT1 and CMT2. CMT1 is a demyelinating neuropathy characterized by decrease of the MNCV (<40 m/s), its inheritance pattern is autosomal dominant. CMT2 is a axonal neuropathy with normal MNCV and it is also inherited in form autosomal dominant. Clinically they are characterized by atrophy and muscular weakness of the distal portion of the legs, causing cavovarus bilateral. Several subtypes of CMT1 and CMT2 have been distinguished depending on the genetic defect. CMT1A is due in 70-90% from the cases to the duplication of the gene PMP22, while 10-30% presents point mutations. The PMP22 gene is located in a region of 1.5 megabases in 17p11.2-p12 and it codes for a protein of 22KDa that is expressed in the peripheral nerve. The objective of the present work is to identify the molecular alterations of the gene PMP22 in CMT1A in a sample of Mexican patients. 12 families were analyzed, 7 of sporadic presentation and 5 relatives. Duplication was observed in three of the cases index patients studied by means of the analysis of FISH, what corresponds to 25% of the 12 cases analyzed, the three cases presented a decrease of the MNCV below 20m/s and they manifested a serious clinical affection. On the other hand 3 silent mutations was detected based on the study of sequence of PMP22 which had not been reported previously. The 3 patients were females and they presented a less serious clinical manifestations on the average with MNCV of 24 m/s. The results suggest the importance of carrying out this type of studies in a bigger number of patients including the analysis of other genes related with the mielinización for a correct molecular diagnosis and appropriate genetic advice



ANTECEDENTES.

ASPECTOS CLÍNICOS EN CHARCOT MARIE TOOTH.

La neuropatía hereditaria motor-sensorial o enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), es un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas con una incidencia de 1 en 2500 (1). La mayoría tienen un patrón de herencia autosómico dominante, sin embargo también se presentan formas autosómico recesivas y recesivas ligadas al cromosoma X (anexo 1). Existe un amplio espectro en la severidad clínica, algunos pacientes pueden ser asintomáticos y tener una deformidad leve del pie en cavo, mientras que otros pueden presentar debilidad muscular grave lentamente progresiva y pérdida sensorial. La mayoría de los pacientes presentan alteraciones en la deambulación. La edad de presentación depende del tipo de CMT, pero frecuentemente es en la segunda década de la vida (2). Los signos iniciales incluyen dificultad para caminar y subir escaleras, al aumentar la gravedad los pacientes compensan este problema, flexionando la cadera a cada paso dando una marcha en "equino". Al examen físico se aprecia disminución de los reflejos osteotendinosos, disminución o pérdida de la sensibilidad y pueden existir otras manifestaciones clínicas como engrosamiento del nervio, tremor, displasia de cadera y disfunción pulmonar. Puede observarse atrofia de los músculos peroneos que se observa clínicamente en las piernas como una copa de champagne. El dolor no es frecuente y su presencia orienta hacia otra patología. La electromiografía (EMG) ayuda a distinguir las formas desmielinizantes de las axonales, esto es fundamental para iniciar con el estudio molecular específico (3,4).

TESIS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD NACIONAL

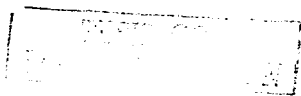
Histológicamente la biopsia de nervio revela la formación de láminas concéntricas de material mielínico alrededor de la fibra nerviosa debido a la desmielinización y remielinización, este hallazgo se conoce como "bulbos de cebolla" los cuales son la causa subyacente del engrosamiento de los nervios periféricos que se reconoce a la palpación (5,6).

ASPECTOS GENETICOS Y BIOQUÍMICOS DE LAS NEUROPATIAS SENSORIALES TIPO 1.

Estas formas de neuropatías se conocen como desmielinizantes. Presentan un patrón de herencia autosómico dominante y se han reconocido 3 tipos desde el punto de vista molecular CMT 1A, 1B y 1C (7).

CHARCOT-MARIE-TOOTH TIPO 1A.

La enfermedad de CMT1A en la mayoría de los casos se debe a una duplicación de DNA en tandem de 1.5 Mb localizada en el cromosoma 17p11.2-p12 (8). Esta región está flanqueada por dos secuencias repetidas de más de 17 kb, denominadas CMT1A-REP proximal y CMT1A-REP distal, ambas con 98% de homología (9). Aparentemente la duplicación es regulada por un elemento génico que tiene la capacidad de transponerse (transposón) (10) y está localizado cerca de un punto de mayor predisposición a mutaciones (hotspot) (11). El hallazgo de duplicación génica o los casos de pacientes que presentan trisomías parciales que involucran la región que contiene al gen PMP22, sugieren que el incremento en la dosis génica aumenta la expresión de la proteína de 22 KDa lo cual provoca el fenotipo CMT1A

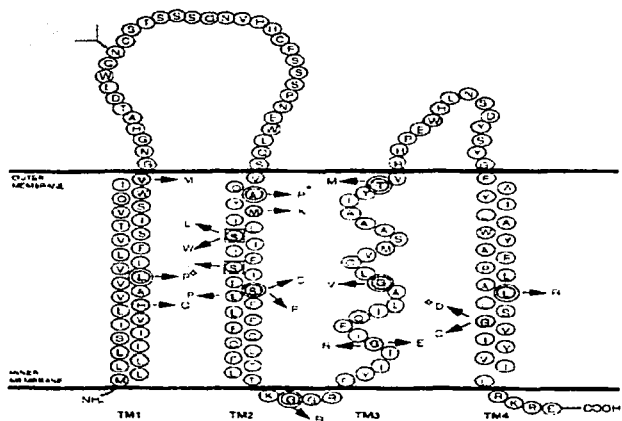


(12,13). El gen PMP22 fue caracterizado a partir de la purificación de transcritos extraídos de las células de Schwann de biopsias del nervio ciático y se identificó como un gen específico de la detención del crecimiento (gas-3). El análisis de la secuencia de PMP22 mostró que contiene 6 exones de los cuales 2 no se traducen y 2 promotores alternativos que se encuentran río arriba. El promotor 1 es similar a todos los promotores tejido-específico con una caja TATA a 30 pb. de distancia río arriba y una secuencia invertida CCAAT hacia el extremo 5' de la caja TATA. El promotor 2 muestra características similares a los genes de "mantenimiento" observándose un alto contenido GpC 352 pb. arriba del sitio inicial de la transcripción. Se expresa principalmente en nervio periférico aunque también se ha observado su expresión en tejidos no neurales (14).

El producto de PMP22 es una glicoproteína integral de membrana, con cuatro dominios transmembranales, se encuentra de manera uniforme en la mielina compacta y comprende entre 2 y 5% del total de proteínas del nervio periférico. La integran 160 aa y tiene un peso molecular de 22Kda (18-kDa polipéptido y 4 kDa de carbohidratos ligados al residuo de asparagina). La porción glicosilada contiene el epítope L2HNC-1, relacionado con procesos de interacción, adhesión y reconocimiento celulares (Fig-1). Se ha propuesto que funciona regulando el crecimiento y la diferenciación de la célula de Schwann, así como controlando el mantenimiento y desarrollo de la mielina. Al parecer las alteraciones en la vía de la degradación de la proteína PMP22 contribuye a la progresión de la enfermedad, debido a su acumulación en los agregomas que son agregados proteicos pericentriolares en las células de Schwann. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual esta acumulación provoca la progresión de la enfermedad (15).



Fig-1.- Esquema de pmp22.



Las mutaciones puntuales encontradas en PMP22 se han asociado con CMT1, DSS y HNPP. La mayoría de estas mutaciones son de sentido equivocado, sin embargo también se han identificado deleciones de una sola base y algunas mutaciones que interrumpen la fase de lectura (Tabla-2). Se han publicado 4 reportes independientes de pacientes donde se estudian mutaciones puntuales que involucran el codón localizado en la posición 72, por lo que se sugiere un "hotspot" en esta región (16). La mayoría de las mutaciones ocurren en codones que codifican para los dominios transmembranales de la proteína. Once de 24 mutaciones son de novo y están asociadas con casos de presentación esporádica. La mayoría de las mutaciones están en estado heterocigoto, manifestándose como alelos



dominantes. Por otro lado se ha observado que los pacientes con mutaciones puntuales en PMP22 tienen un fenotipo más grave comparados con los que presentan duplicaciones (17).

Tabla 2.

Mutaciones puntuales de PMP22.

MUTACION	RESIDUO	FENOTIPO	REFERENCIA
19_20delAG	Leu7fs	HNPP	Nicholson et al., 1994 (18).
36C>A	His12Gln	DSS	Valentijn et al., 1995 (19).
47T>C	Leu16Pro	CMT1	Valentijn et al., 1992 (20).
56T>C	Leu19Pro	DSS	Haites et al., 1998 (21).
73_78delGTCATC	Val25_Ser26del	CMT1	Mersiyanova et al., 2000 (22).
78+1G>T	5'-empalme	HNPP	Bort et al., 1997 (23).
87C>T	Ile29Ile	polimorfismo	Nelis, 1998 (24).
88G>A	Val30Met	HNPP	Sahenk et al., 1998 (25).
110A>T	Asp37Val	CMT1	Fabrizi et al., 1999 (26).
179-1G>C	3'-empalme	HNPP	Meuleman et al., 2001 (27).
179-2A>G	3'-empalme	CMT1	Ekici et al., 2000 (28).
183G>A	Trp61stop	HNPP	Haites et al., 1998 (21).
199G>C	Ala67Pro	CMT1 + sordera	Kovach et al., 1999 (29).
206T>A	Met69Lys	DSS	Roa et al., 1993 (30).
214T>C	Ser72Pro	DSS	Ainsworth et al., 1998 (31). Ekici et al., 2001 (28)
215C>G	Ser72Trp	DSS	Tyson et al., 1997 (32).
215C>T	Ser72Leu	CMT1 / DSS + sordera / HC	Roa et al., 1993 (33) Ionasescu et al., 1996 (34) Marques et al., 1998 (35). Simonati et al., 1999 (36). Bissar-Tadmouri et al., 2000 (37). Ceuterick-de Groote et al., 2001 (38). Mostacciolo et al., 2001 (39).

227G>T	Ser76Ile	DSS + sordera	Tyson et al., 1997 (32).
235T>C	Ser79Pro	DSS	Bort et al., 1998 (49).
236C>G	Ser79Cys	CMT1	Roa et al., 1993 (41).
238_239delCT	Leu80fs	DSS	Ikegami et al., 1998 (42).
239T>C	Leu80Pro	DSS	Tyson et al., 1997 (32).
251_253delTCT	Phe84del	DSS (malformaciones craneales múltiples)	Silander et al., 1998 (43). Yener et al., 2001 (44).
277G>C	Gly93Arg	CMT1	Ohnishi et al., 1995 (45).
281delG	Gly94fs	CMT1	Ionasescu et al., 1995 (46).
281 282insG	Gly94fs	HNPP	Young et al., 1997 (47). Lenssen et al., 1998 (48).
298G>A	Gly100Arg	DSS	Bort et al., 1997 (23).
299G>A	Gly100Glu	DSS	Marques et al., 1998 (35).
319+1G>A	5'-empalme	CMT1	Nelis et al., 1994 (49).
320G>T	Gly107Val	CMT1	Marrosu et al., 1997 (50).
325T>C	Cys109Arg	CH	Fabrizi et al., 1999 (26)
327C>T	Cys109Cys	polimorfismo	Bort et al., 1997 (23).
353C>T	Thr118Met	CMT1 hemicigoto / polimorfismo heterocigoto	Roa et al., 1993 (41). Nelis et al., 1994 (49) Haites et al., 1998 (21) Seeman et al., 1999 (51) Mersiyanova et al., 2000 (22).
364-365delCC	Pro122fs	HNPP	Bissar-Tadmouri et al., 2000 (37)
372G>A	Trp124stop	HNPP	Pareyson et al., 1996 (52)
409A>G	Ile137Val	polimorfismo	Bort et al., 1997 (23)
434delT	Leu145fs	HNPP	Pareyson et al., 1997 (53).
440T>G	Leu147Arg	CMT1	Navon et al., 1996 (54). Mersiyanova et al., 2000 (22).
447C>A	Ser149Arg	DSS	Ohnishi et al., 2000 (55).
448G>T	Gly150Cys	DSS	Ikegami et al., 1998 (42)
449G>A	Gly150Asp	DSS	Ionasescu et al., 1997 (56).

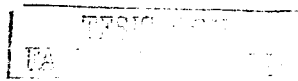
[469C>G] + [469C>G]	Arg157Gly	CMT1 hemicigoto	Numakura et al., 2000 (57)
[469C>T] + [469C>T]	Arg157Trp	DSS	Parman et al., 1999 (58)

CMT1 Charcot Marie Tooth tipo 1, DSS síndrome de Dejerine Sottas, HNPP Neuropatía con predisposición a parálisis por presión HC hipomielinización congénita

CHARCOT-MARIE-TOOTH TIPO 1B.

Es una enfermedad genética con patrón de herencia autosómico dominante. El gen responsable se denomina MPZ (Mielin Protein Zero) y se ha mapeado en el cromosoma 1q22-23, adyacente al locus Duffy. Está regulado por un sólo promotor y contiene 6 exones. MPZ (59).

El gen MPZ codifica para la síntesis de la proteína PO, que es una proteína de tipo estructural con un peso molecular de 28 kDa y representa más del 50% del total de las proteínas que componen la mielina. Los exones 1, 2 y 3 codifican para el dominio extracelular, que es una porción hidrofóbica glicosilada similar a las cadenas variables de las inmunoglobulinas. Este segmento es necesario para la adhesión celular y tiene un papel fundamental en la formación y compactación de la mielina (60). El dominio transmembranal está codificado por el exón 4 y se ha asociado clínicamente con desmielinización grave, e incluso con hipomielinización congénita. Los exones 5-6 codifican para la región citoplasmática de PO. Se han reportado más de 50 mielinopatías diferentes asociadas con mutaciones en MPZ, sin embargo la mayor frecuencia de mutaciones se han observado en el dominio extracelular, siendo generalmente de sentido equivocado (61).



CHARCOT-MARIE-TOOTH TIPO 1C.

En algunas familias con CMT1 y patrón de herencia autosómico dominante, se han observado mutaciones en el gen EGR2 (early growth response 2 –EGR2) mapeado en la región cromosómica 10q21.1-q22.1. El gen contiene dos exones y codifica para la síntesis del factor de respuesta temprana al crecimiento 2. EGR2 pertenece a un grupo de multigenes que codifican proteínas implicadas en la diferenciación y proliferación celulares. Su expresión en el SNP se ha asociado específicamente a mielinización. Una mutación recesiva y cuatro dominantes se han asociado a los fenotipos CMT1, DSS y RLS (62).

SÍNDROME DE DEJERINE-SOTTAS (DSS).

DSS fue descrito inicialmente como una neuropatía hipertrófica intersticial de la infancia. Es una forma más severa de desmielinización. El padecimiento generalmente comienza en la infancia y se asocia con una gran disminución en las VCM (<6 a 12 m/s). En este síndrome se han descrito mutaciones puntuales en los dominios transmembranales de PMP22 (63).

SÍNDROME DE ROUSSY-LEVY (RLS).

RLS. fue reportado en pacientes que presentaban pie cavo, debilidad de las extremidades a nivel distal, arreflexia, pérdida de la sensibilidad distal, marcha atáxica y tremor. En este síndrome se ha reportado el hallazgo de duplicación génica de PMP22 (64).



GENETICA DE LAS NEUROPATÍAS HEREDITARIAS MOTORAS- SENSORIALES TIPO 2.

Este tipo de neuropatías se conocen como formas axonales y todas con un patrón de herencia autosómico dominante. Se han reconocido desde el punto de vista molecular los tipos CMT 2A , 2B, 2C y 2D.

CHARCOT-MARIE-TOOTH TIPO 2A.

Aún se desconoce el gen y la proteína involucrados, sin embargo estudios de ligamiento han mapeado al gen candidato en 1p35-36. La edad de presentación es entre los 3 y 15 años, los síntomas que se presentan son alteraciones en la marcha, dificultad para correr y subir escaleras, las VCM del nervio mediano se encuentran dentro del rango normal (65).

CHARCOT-MARIE-TOOTH TIPO 2B.

El gen responsable de la enfermedad se ha ligado al brazo largo del cromosoma 3. La sintomatología inicia generalmente en la segunda década de la vida. Clínicamente existe pérdida sensorial y debilidad distal, principalmente localizada en extremidades inferiores, los reflejos tendinosos son normales, en ocasiones el reflejo en el tendón de Aquiles se encuentra ligeramente disminuido. Se acompaña frecuentemente de acromutilación y úlceras en los pies. Existe pérdida axonal completa con ausencia de potenciales en el nervio sural (66).

CHARCOT-MARIE-TOOTH TIPO 2C.

En 1994 se describieron dos familias con neuropatía caracterizada por grados variables de debilidad de las extremidades, cuerdas vocales y músculos intercostales, sin pérdida sensorial. El inicio en todos los casos es en la infancia con una expectativa de vida corta debido a los problemas respiratorios. Las VCM se encontraban dentro de límites normales con datos electromiográficos de degeneración axonal. Al parecer el padecimiento se encuentra ligado al brazo largo del cromosoma 5 (67).

CHARCOT-MARIE-TOOTH TIPO 2D.

Esta neuropatía se ha mapeado en 7p14. El inicio de la enfermedad es entre los 16 y 30 años, las manifestaciones clínicas son debilidad distal de extremidades con pérdida sensorial. Los reflejos osteotendinosos están ausentes en las extremidades superiores y disminuidos en las inferiores. Las VCM son normales con alteración axonal (68).

CHARCOT-MARIE-TOOTH LIGADO AL CROMOSOMA X.

Esta neuropatía presenta un patrón de herencia dominante ligado al cromosoma X y se ha mapeado en Xq13.1. El gen Cx32 responsable de este padecimiento contiene 2 exones regulados por dos promotores alternativos, de los cuales solo uno se expresa en el nervio periférico (69).

El gen CX32 codifica para una proteína de hendidura de unión β denominada conexina 32. La unión de 6 conexas forma un hemicanal conocido como conexón y dos conexones entre las células forman un canal funcional que permite el paso de iones y pequeñas moléculas



que nutren el cuerpo y los pliegues de la célula de Schwann. $\beta 1$ se localiza en la mielina no compacta en el paranodo y en las hendiduras de Schmitt-Lanterman (70).

Los pacientes presentan clínicamente debilidad muscular distal de manos y pies acompañado de pérdida propioceptiva temprana. Los reflejos osteotendinosos se encuentran ausentes y en ocasiones se acompaña de pérdida auditiva bilateral. Las VCM se encuentran dentro de lo normal con datos de pérdida axonal. Esta alteración es provocada esencialmente por degeneración de las raíces de los nervios espinales, especialmente las motoras de las partes distales de las extremidades (71).

El defecto génico en CX32 conduce a una disminución de la proteína ubicada en la superficie de la membrana, provocando un efecto dominante negativo con otras conexinas. Se han identificado más de 200 mutaciones y la mayoría son de tipo puntual de sentido equivocado. La severidad de la patología se relaciona con el grado de la pérdida en la función proteica. Los fenotipos más graves se han asociado a mutaciones sin sentido en el aminoácido 22 e inserciones o deleciones que interrumpen el marco de lectura en la región aminoacídica 175 (72).

GENETICA Y CLINICA DE LA NEUROPATIA HEREDITARIA CON PREDISPOSICION A PARALISIS POR PRESION (HNPP).

La región implicada en la HNPP corresponde a la región cromosómica 17p11.2 que incluye al gen PMP22 (73). La edad de presentación es entre 15 y 20 años de edad (74). Las manifestaciones clínicas incluyen deformidad en cavo del pie, atrofia muscular peronea, debilidad muscular distal así como parálisis transitoria peronea bilateral. La sintomatología se presenta después de permanecer de rodillas durante un corto periodo (75). El estudio de



EMG reporta latencias distales prolongadas de peroneos y nervios medianos con disminución en las VCM (76.77). El estudio histopatológico es característico y muestra la presencia de imágenes de las vainas de mielina en forma de salchicha (de donde proviene el término de Neuropatía Tomaculous: tomaculum=embutido) tanto en los nervios motores como en los sensitivos (78).

TELEFONIA
FALLA DE ALIEN

JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han observado grandes avances en el conocimiento de la patogénesis y manejo de las neuropatías periféricas (NPs). Las NPs son un subgrupo de las enfermedades neuromusculares, donde se afecta la función muscular debido a un defecto en la mielinización o mantenimiento de la función del axón del nervio periférico. Inicialmente fueron clasificadas desde el punto de vista clínico, sin embargo con la nueva tecnología molecular se ha logrado entender las bases genéticas de las NPs hereditarias. CMT1A representa un problema grave de discapacidad, por lo que el estudio de la alteración molecular del gen PMP22 en pacientes mexicanos, permitiría un mejor seguimiento de los pacientes y un asesoramiento genético adecuado.

Con base en los antecedentes descritos el planteamiento de nuestra pregunta de investigación es la siguiente

¿Cuales son las alteraciones moleculares del gen PMP22, en los enfermos con CMT1 y sus familiares en una muestra de pacientes mexicanos?

OBJETIVO

Conocer cuales son las alteraciones moleculares del gen PMP22 en enfermos con CMT1 y sus familiares en una muestra de pacientes mexicanos



DISEÑO DEL ESTUDIO.

Transversal descriptivo, prospectivo y analítico.

MATERIAL Y METODOS.

1.- Selección de los sujetos de estudio:

Se estudiarán 12 familias con diagnóstico clínico y electromiográfico de CMT1. En 7 familias solo hubo un sujeto afectado y 5 fueron con presentación familiar. El estudio clínico se realizará por un médico especialista en Rehabilitación y por un especialista en Ortopedia, la escala de medición de la severidad clínica de la deformidad del pie, se basó en la Clasificación de la Sociedad Ortopédica Americana de pie y tobillo (Dolor:40 puntos, Función: 50 puntos y alineación: 10 puntos). Se realizará hibridación in situ fluorescente en células en interfase de linfocitos de sangre periférica en los casos índice y en los casos familiares, sumando un total de 27 casos (12 casos índice y 15 familiares), posteriormente en los casos donde no sea posible encontrar la duplicación se realizará análisis de secuenciación para detectar mutaciones puntuales. se incluirán 25 controles sanos.

Criterios de inclusión:

- a.-Pacientes de cualquier sexo o cualquier edad, con estudio clínico y electromiográfico compatible con CMT1A
- b.-Que acepte participar en el estudio.

Criterios de exclusión.

- a. - Que no acepte participar en el estudio.

Criterios de eliminación:

- a.- Cuando no sea posible realizar de manera total el procedimiento de los estudios.
- b - Que el diagnóstico no corresponda CMT1A.



2.- Definición de variables.

Variable dependiente: Alteraciones moleculares específicas de CMT1A.

Variable independiente: Los pacientes con CMT1A.

3.- Definición operativa de variables.

Variable dependiente:

Alteración molecular

- a) Duplicación del gen PMP22: Corresponde a la visualización de 3 copias del gen PMP22 mediante hibridación in situ fluorescente con la sonda específica de esta región.
- b) Mutación Puntual. Corresponde a una modificación en la secuencia normal de DNA del gen PMP22 identificada mediante secuenciación directa del gen.

Variable independiente. Pacientes que presenten datos clínicos compatibles con CMT1A y que el estudio de EMG reporte VCM < 40 m/s en los nervios medianos, se complementa con la corroboración de la variable dependiente.

4 - Procedimiento

A) Hibridación in situ fluorescente (FISH).

Para la realización de *hibridación in situ* en los pacientes con CMT1A, se tomaron 3ml de sangre periférica mediante punción de la vena antecubital. En base al proceso de cultivo de linfocitos de sangre periférica se obtuvieron núcleos en interfase, debido a que la marca no es visible en metafase.

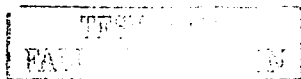
Para la construcción de la sonda se utilizaron 300ng de DNA genómico como template, se amplificó el exón 1 y 2 del gen PMP22 por medio de PCR. Se utilizó un volumen total de 50



μ l, que contenía: 1x de 10mM Tris, 50 mM KCl, 3 mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTPs más 0.06 de dUTPs espectro rojo (Vysis), 1 μ M, de los oligonucleótidos específicos. Los tiempos de amplificación fueron: 1 min 94°C, 1 min 60°C y 1 min a 72°C por 35 ciclos, con una enzima Taq XL. Se procedió a la precipitación del producto en una solución de acetato de sodio a 3M y etanol al 100%, encontrando una sonda de 9 kb. Por otra parte se utilizará la sonda de 30-kb cRCNeu1 específica para la región 17p11.2 y la sonda pvaw409r1 específica para la región 17q12, lo cual se realizará en el laboratorio de citogenética de Kleberg en el colegio de Baylor Texas. (91). Posteriormente se procedió a realizar la hibridación en base a métodos estándares (79).

Preparación de las laminillas: Después de la fijación y el extendido de los núcleos en interfase en la laminilla y el secado al aire se prosiguió a la deshidratación en una serie de etanol al 70%, 90% y 100% (10 minutos en c/u) a temperatura ambiente, se secaron por corto tiempo y se pusieron las laminillas en contenedores sellados a -70°C.

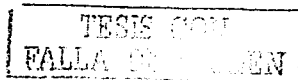
Desnaturalización y mezcla de la sonda: Posterior a la precipitación con 5 μ g de DNA de esperma de salmón, se adicionó 1/20 vol. de 3M acetato de sodio y 2 vol. de etanol, mezclándose bien, se incubó a 70°C por 30', se realizó centrifugación en eppendorf por 15', se decantó el sobrenadante y se lavó el botón adicionando 400 μ l de etanol al 70%, se resuspendió el botón en 5 μ l de formamida desionizada agitando vigorosamente por varios minutos. Se colocaron 5 μ l de buffer de hibridación (4xssc y 20% de dextran sulfato) y se mezcló durante 1 min (durante este paso se procedió con la desnaturalización de los cromosomas). Se desnaturalizó la sonda incubando a 75°C durante 5' seguido de un enfriamiento en hielo por 5', aplicando la sonda a la cromatina desnaturalizada (80,81).



Desnaturalización de la cromatina en interfase e hibridación: Se precalentaron las laminillas a 50-60°C en una incubadora para prevenir que se formaran burbujas en las laminillas. Se colocó la solución de desnaturalización (formamida desionizada al 70% y 2xssc a ph 7) en un vaso coplin en un baño de María a 70°C. chequeando la temperatura con un termómetro dentro de la solución. Se pusieron las laminillas precalentadas en el vaso coplin dentro de la solución de desnaturalización, incubando por 2'. Se pasaron las laminillas por una serie de etanol frio al 70%, 90% y 100% durante 3' c/u. secando posteriormente al aire (82,83). Se agregaron 10µl de mezcla de hibridación con la sonda a la cromatina desnaturalizada. Poniendo un cubreobjetos de 18mm evitando que se formaran burbujas de aire, sellando los bordes con cemento de rubber. Posteriormente se transfirieron las laminillas a una cámara húmeda sobre toallas de papel e incubando a 37°C toda la noche (84-86).

Detección. Se sacaron las laminillas de la cámara húmeda y cuidadosamente se removió el cemento de rubber utilizando pinzas. Se transfirieron las laminillas dentro de un coplin conteniendo la solución de lavado (50% formamida y 2x SSC precalentada a 42°C) y se agitó por 10-15' hasta que los cubreobjetos se despegaron. Se transfirieron las laminillas sin cubreobjetos dentro de un nuevo coplin con solución de lavado y se agitó por 5'. Se adicionó 200µl de solución de bloqueo (4xssc y 3% de bsa fracción v.) y se cubrió con un portaobjetos de 22x40 mm transfiriendo las laminillas dentro de la cámara húmeda se incubó a 37°C por 30' (87,88)

Se analizarán 100 linfocitos en interfase para cada caso, considerándose positivo cuando se observe la duplicación en más de 70 células analizadas. El estudio se realizará en un microscopio Carl Zeiss, std 25 equipado con una lámpara de epifluorescencia de una fuente de luz Xenón y con filtro de triple banda que permite visualizar una o más marcas



fluorescentes, las imágenes se captarán con una cámara digital "sensi-color", en un sistema digital de Axon instruments. Se enviarán 9 muestras de pacientes al colegio de Baylor para su análisis citogenético como control intraobservador.

B) Secuenciación:

Se analizarán los casos Índice y los familiares afectados, por cada caso positivo se utilizará un control familiar y mínimo 2 controles no relacionados.

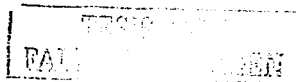
El análisis de secuenciación del gen PMP22 se realizará en un analizador genético Abi prism 310.

Condiciones de PCR: Se utilizó un volumen total de 50 µl, que contenía: 1x de 10mM Tris, 50 mM KCl. 3 mM de MgCl . 200µM de dNTPs, 1µM, de cada uno de los oligonucleótidos específicos (tabla 2). Los tiempos de amplificación fueron; 1 min 94°C, 1 min 60°C y 1 min a 72°C por 35 ciclos. Los tiempos de inyección en el equipo fueron de 20 minutos

Tabla 2.- Secuencia de Oligonucleótidos, tamaño del amplificado y de los 4 exones en pares de bases.

Oligonucleotidos	Tamaño del amplificado*.	Tamaño del exón*.
Exón 1 F-aca gtc ttg gca tca cag gct tca R-ctg aag cca gac cag gcg tct ttc	202	78
Exon 2 F-ctc ctc gca ggc aga aac tc R-ctg aac cag cag gag cac ggg	156	100
Exon 3 F-tgg cca gct ctc cta ac R-cac ccc gct tcc aca tg	217	142
Exon 4 F-gcc atg gac tct ccg tc R-cct atg tac gct cag ag	249	163

*Roa et al. (41)



4.- Métodos estadísticos.

Se realizará estadística descriptiva.

CONSIDERACIONES ETICAS.

Se informó a los pacientes, o en su caso al padre o tutor, sobre las características del estudio, invitándolos a participar en él en forma voluntaria. Con previa lectura y firma de la carta de consentimiento informado se procederá a continuar el estudio (Anexo 1). El protocolo ha sido evaluado y aprobado por el comité de investigación y bioética de las Instituciones participantes.



RESULTADOS

Se estudiaron 12 familias, los casos índice fueron 7 pacientes del sexo masculino y 5 del femenino. Las principales datos de los pacientes se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. - Características clínicas, patrón de herencia resultados de FISH y secuenciación de los 12 pacientes afectados no relacionados.

Nº de familia	Edad del caso índice	Nº de afectados	Sexo	VCM m/s	Exploración clínica	Severidad Clínica*	FISH	Secuencia
1	10a	1	f	25	Cavo-varo reflejos++ FM 2	Moderada 60 puntos	ni	45 G +C Val15Val
2	10a	1	m	16	Equino-varo dedos en garra reflejos ausentes	Grave 35 puntos	Dup	ni
3	14a	1	m	27	Cavo reflejos++ FM 4	Leve 80 puntos	ni	ni
4	5a	3	f	29	Equino-varo dedos en garra reflejos++	Moderada 65 puntos	ni	ni
5	10a	2	f	25	Cavo-varo reflejos+ FM 3	Moderada 70 puntos	ni	471 G +C Arg:57Arg
5*	30a	7	m	15	Cavo-varo, dedos en garra reflejos ausentes FM 3	Grave 30 puntos	Dup	ni
7	27a	1	f	18	Cavo reflejos + FM2 sensibilidad+ dedos en garra	Grave 25 puntos	Dup	ni
8	18a	1	m	22	Varo reflejos++ sensibilidad++ FM 4	Leve 85 puntos	ni	ni
9*	13a	5	m	27	Cavo camptocastia reflexos++ FM 2	Moderada 65 puntos	ni	ni
10	17a	1	f	23	Cavo sensibilidad++ FM 2	Leve 83 puntos	ni	159 T +C Cys53Cys
11*	15a	1	m	25	Cavo ausentes sensibilidad+ FM3	Moderada 50 puntos	ni	ni
12	18a	1	m	18	Cavo-varo sensibilidad++ reflejos++ FM 4	Moderado 65 puntos	ni	ni

*Familiares, (FM) Fuerza muscular, (Dup) duplicación, *Clasificación de la Sociedad Americana de pie y tobillo (Dolor: 40 puntos, Función: 50 puntos y atineación: 10 puntos).

Siete de los casos fueron esporádicos y 5 familiares. En 2 de los casos familiares el CMT se observó en 4 generaciones, solamente en una de ellas se observó la duplicación. En 3 familias la enfermedad se manifestó en 2 generaciones. En la familia nº6 con CMT1 donde se detectó la duplicación, un miembro de 6 años presentó afección grave del pie, fasciculaciones y un reporte histológico describiendo datos de desmielinización importante con la formación de numerosos bulbos de cebolla, lo que corresponde a un síndrome de Dejerine-Sottas, el árbol genealógico se muestra en la fig 2.

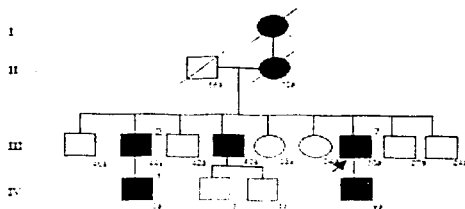
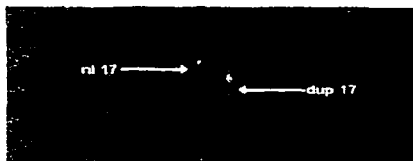


Fig 2 - Árbol genealógico de una familia con el espectro fenotípico CMT1 y Dejerine-Sottas
 IV-1. Paciente masculino 5a de edad con síndrome de Dejerine Sottas con la duplicación
 III-7 Paciente masculino con fenotipo CMT1 con la duplicación
 III-2 Paciente masculino de 44a con cuadro clínico CMT1 y duplicación

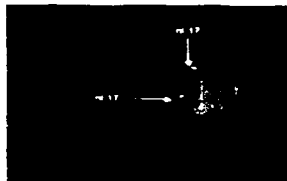
El análisis de FISH en interfase reveló la duplicación de PMP22 en tres pacientes no relacionados, lo que supone la región de hibridación específica en 17p11.2 y dos marcas en 17q. En el resto de los casos índice sólo se apreciaron dos marcas en la región de PMP22

(fig 3), por lo cual se excluyó la duplicación. Este análisis representa 25% de los 12 casos índice analizados. De los pacientes que presentaron la duplicación 2 fueron hombres y 1 mujer, uno de estos casos era familiar (nº 6) y los otros 2 esporádicos (nº 2 y 7), los tres pacientes manifestaban una disminución importante de las vcm que se encontraba por debajo de los 20nvs además de presentar una afección clínica grave. La familia con la duplicación correspondía al caso de CMT1A con Dejerine-Sottas. El análisis de FISH en tres de los miembros afectados presentaba la duplicación confirmando el resultado de CMT1A. El estudio de FISH se realizó en 14 pacientes de los cuales 5 tuvieron la duplicación en todos los casos se incluyeron controles sanos.

a)



b)



El estudio de FISH en los casos índice de duplicación de cromosoma 17 se realizó en 14 pacientes de los cuales 5 presentaron la duplicación en todos los miembros afectados. En los otros 9 casos se incluyeron controles sanos de la misma edad y sexo. Se incluyeron 14 controles sanos.

El análisis de secuencia de los 4 exones del gen PMP22 en los 9 casos índice en los que no se apreció la duplicación reveló tres mutaciones silentes diferentes en 3 pacientes femeninos



no relacionados que corresponden a las siguientes sustituciones: G45C (Val15Val) en el exón 1 (fig 4), T159C (Cys53Cys) en el exón 2 (fig 5) y G471C (Arg157Arg) en el exón 4 (fig 6). Estos cambios corresponden a 2 transversiones y 1 transición.

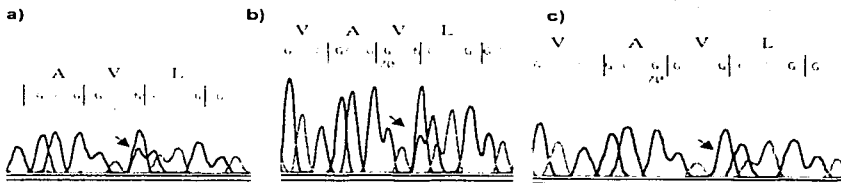


Fig 4 - Mutación silente que sustituye una citosina por una guanina en el codón 15 del exón 1 del gen PMP22. a y b manifiestan la secuenciación del mismo paciente por duplicado y c un control sano del mismo sexo y la misma edad

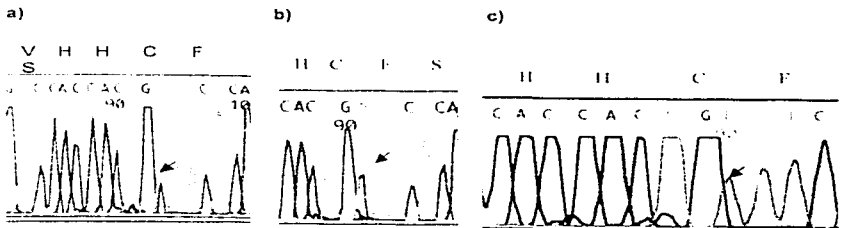
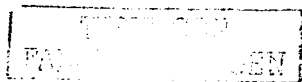


Fig 5 - Mutación silente que sustituye una citosina por una timina en el codón 53 del exón 2 del gen PMP22. a y b, muestran la secuenciación del mismo paciente por duplicado y c un control sano



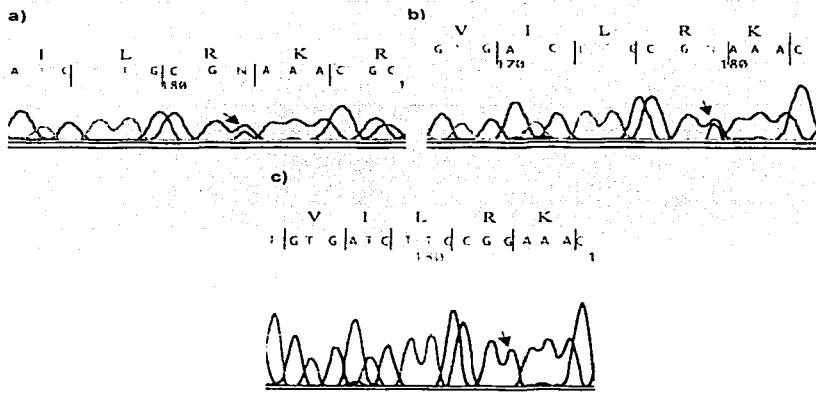
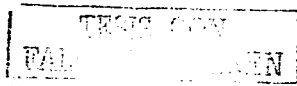


Fig 6 - Electroferogramas del caso familiar de CMT1, en el que se aprecia una mutación silente que sustituye una citosina por una guanina en el codón 157 del exon 4 del gen PMP22. a - Secuencia del caso índice. b - muestra la secuencia del padre de la propositus afectada con el mismo padecimiento y el hermano mayor sano

Dos de los casos eran de presentación esporádica y uno familiar que corresponde a la familia nº 5 descrita en la tabla 3. En esta familia se observaron dos casos afectados donde el estudio de secuenciación reveló el hallazgo de una mutación silente del codón 157 en el padre y la hija, se realizó el estudio al hijo mayor sano no encontrando dicha mutación. El cuadro clínico era similar, no existiendo diferencias en el estudio de EMG ni de la biopsia de nervio sural, el árbol genealógico se detalla en la figura 7.



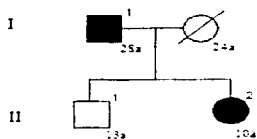
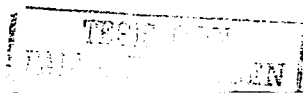


Fig 7 - Arbol genealogico de una familia con CMT1.
 I-1. Masculino de 28 años con la mutación G471C (Arg157Arg).
 II-2 Caso Índice de 10años con la presencia de la mutación G471C (Arg157Arg).
 II-1 Masculino sano sin la mutación.

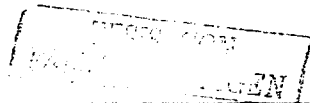
Para descartar la asociación de estos polimorfismos con el CMT1A se analizaron 25 controles sanos no relacionados, sin identificarse en ninguno de ellos las mutaciones referidas.

DISCUSION

El mecanismo de formación de las duplicaciones génicas se ha estudiado en forma experimental en bacterias, levaduras y en la mosca de la fruta, observando que este proceso de la duplicación se debe a una recombinación homóloga desigual entre secuencias génicas similares (76). Para la detección de duplicaciones génicas en CMT1A se han utilizado diferentes herramientas moleculares como son el estudio de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs), electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) y PCR con marcadores polimórficos de GT, CA y de AC contenidos en la duplicación génica (89). El análisis molecular mediante FISH permite observar directamente la duplicación y detectar incluso posibles casos de mosaicismo somático, analizando núcleos en interfase de linfocitos de sangre periférica, por lo que resulta un método de elección adecuado en estos casos (90-91). En el presente trabajo el análisis mediante FISH permitió la identificación de la duplicación de PMP22, la cual se encontró solamente en 25% de los casos. Esta información nos permitió establecer el diagnóstico de CMT1A. Aún cuando la muestra no fue muy grande, este pequeño porcentaje de casos afectados con la duplicación de PMP22 diferiría a lo reportado en la literatura, ya que la forma CMT1A con este duplicación es la más frecuente. Considerando la información en la literatura se esperaría encontrar cuando menos 60% de los casos con CMT1A en la muestra analizada, por lo que es importante estudiar una población mayor para confirmar este hallazgo. Uno de los aspectos interesantes del CMT1A representa la "ganancia de función" como consecuencia en la mayoría de los casos de la duplicación génica. El exceso de expresión produce un aumento en la concentración de la proteína PMP22 desestabilizando el proceso de mielogénesis. Pocas entidades son consecuencia de la presencia de 3 alelos, tal es el caso de algunas hemoglobinopatías (92).



cierto tipo de hipertensión hereditaria (93) y el síndrome de Bardet-Biedl (94). Por otro lado no sólo las duplicaciones del gen PMP22 producen la enfermedad ya que también se han reportado mutaciones puntuales, especialmente en los dominios transmembranales de la proteína. En el presente trabajo se analizaron los 4 exones codificantes del gen PMP22, detectándose en 3 pacientes femeninos no relacionados tres mutaciones silenciosas diferentes, dos transiciones y 1 transversión: G45C (Val15Val), T159C (Cys53Cys) y G471C (Arg157Arg), las cuales no habían sido reportadas en la literatura. Dicho hallazgo se buscó intencionadamente en familiares y 20 controles sanos sin identificarse en ninguno de ellos, lo cual sugiere fuertemente que pudieran estar estrechamente relacionados con la enfermedad como se ha informado para CMT1 ligado al X y los polimorfismos o mutaciones silentes del gen P0 (95). Es conveniente mencionar un defecto comparable que causa la b+talasemia observado en el codón 24, en donde la mutación no cambia el aminoácido codificado (GGT por GGA, en donde ambos codifican una glicina), lo que representa una mutación sinónima que no tiene un efecto neutral en el fenotipo (96). Este defecto molecular pudiera no ser exclusivo de la b+talasemia y encontrarse en otros padecimientos como sería el caso de CMT1A. El efecto de ganancia de función, observado tanto en la duplicación de PMP22 como en mutaciones puntuales, la gran variabilidad fenotípica en pacientes con la misma mutación y la presencia del mismo fenotipo con diferentes mutaciones aún en distintos genes, refleja la participación de factores ambientales y epigenéticos participando en la patogénesis de las neuropatías desmielinizantes. Este efecto pudimos observarlo en nuestra familia en la cual se asoció CMT1A y el síndrome de Dejerine-Sottas. Aún cuando, en ambos casos se han detectado duplicaciones de PMP22, su asociación no es la regla y éste parecería ser el primer caso en donde ambos padecimientos se presentan en una misma familia. La asociación que más frecuentemente se ha observado es CMT1A y el síndrome de



Rousse-Levy. Más aún, en el síndrome de Dejerine-Sotas se han demostrado mutaciones puntuales en el gen PZ, para el cual no se han reportado cambios en CMT1A.

La identificación de variantes génicas en determinados padecimientos es de gran valor en el área de investigación genética, ya que permite conocer los mecanismos de producción de mutaciones, entender algunos aspectos de la variabilidad fenotípica y reconocer la interacción génica. En el caso de nuestra área de investigación que corresponde a las neuropatías periféricas desmielinizantes, es necesario analizar los distintos genes implicados en su etiología como son MPZ, Cx y EGR2 para tener la certeza diagnóstica y así poder descartar los subtipos de neuropatías CMT1. Esta información permitirá conocer el comportamiento de estos padecimientos en nuestra población. Sin embargo, todos estos datos resaltan la importancia de estudios más completos y no limitados a análisis génicos en búsqueda de mutaciones. El conocimiento de las interacciones celulares y el proceso de desarrollo de las estructuras nerviosas es fundamental para tener un entendimiento claro del padecimiento. El análisis de los genes sólo representa un primer paso.

En conclusión en el presente trabajo encontramos la duplicación de PMP22 en una menor proporción de casos en comparación a lo reportado previamente en la literatura e identificamos 4 polimorfismos en el gen PMP22 asociados fuertemente al CMT1. Por otro lado, es fundamental realizar un estudio integral que incluya aspectos clínicos y moleculares en este tipo de pacientes para establecer un diagnóstico correcto y así poder ofrecer un asesoramiento genético adecuado.

FALLA DE ORIGEN

Anexo 1

Neuropatías Periféricas Hereditarias, genes asociados y patrón de herencia (3,4).

Neuropatía Hereditaria	Mapeo cromosómico	Patrón de Herencia
CMT1A	PMP22 (Proteína mielín periférica), duplicación en17p11.2-p12	Autosómico dominante
CMT1B	MPZ (Proteína mielín cero), 1q22-q23.	Autosómico dominante
CMT1C	EGR2 (Factor de crecimiento de respuesta temprana 2), 10q21.1-q22.1	Autosómico dominante
CMT2A	1p35-p36	Autosómico dominante
CMT2B	3q	Autosómico dominante
CMT2B1	1q21.2-q21.3	Autosómico recesivo
CMT2B2	19q13.3	Autosómico recesivo
CMT2C	5q	Autosómico dominante
CMT2D	7p14	Autosómico dominante
CMT3A	1q21.3	Autosómico recesivo
CMT3B	10q23.2	Autosómico recesivo
CMT4B2	11p15	Autosómica recesiva
CMT4C	5q23-q33	Autosómica recesiva
CMT4D	8q24	Autosómica recesiva
CMT4E	10q21-q22.	Autosómica recesiva
CMT4F	19q13	Autosómica recesiva
CMT lig X1	Conexina-32, Xq13.1	Ligado al cromosoma X semidominante.
CMT lig X2	Xp22.2	Ligado al cromosoma X Recesivo.
HNNP	PMP22 (Proteína mielín periférica), deleción en 17p11.2-p12	Autosómico dominante
Dejerine-Sottas	17 p11.2, PMP22 1q22 8q23-q24	Autosómico dominante Autosómico recesivo Autosómico dominante
Síndrome de Andermann . Agenesia de cuerpo calloso	15q13-q15	Autosómico recesivo
CMT4A	8q13-q21.1	Autosómica recesiva
CMT4B1	11q22 MTMR2 (Proteína asociada a miotubularina 2.	Autosómica recesiva



Anexo 2.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

México D.F. a _____ de _____ de _____.

A quién corresponda:

Por medio de la presente hago de su conocimiento que he dado mi consentimiento para participar en el proyecto " ESTUDIO MOLECULAR DE PMP22 EN PACIENTES CON CHARCOT MARIE TOOTH TIPO 1A." que realizará el Dr. Norberto Leyva García en el servicio de Genética del Centro Nacional de Rehabilitación-Ortopedia y en el servicio de genética del Hospital General de México, lo cual he aceptado libre y voluntariamente.

He sido informado sobre el procedimiento del estudio que consiste en la extracción de 4 ml de sangre por punción de una vena periférica del brazo. La información obtenida será confidencial. Tengo el entendimiento que de este estudio se obtendrá como beneficio el desarrollo de procedimientos diagnósticos más eficaces y un mejor conocimiento de mi enfermedad. Por otra parte, estoy en libertad de retirarme del estudio en el momento que lo desee sin que esto modifique la calidad de atención médica que reciba.

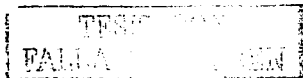
NOMBRE DEL PACIENTE _____

FIRMA DEL PACIENTE, PADRE O TUTOR: _____

RESPONSABLE DEL PROYECTO:

DR. NORBERTO LEYVA GARCIA.

FIRMA: _____

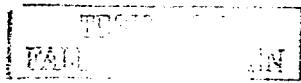


BIBLIOGRAFIA.

1. Dyck PJ, Oviatt KF, Lambert EH. Intensive evaluation of referred unclassified neuropathies yields improved diagnosis. *Ann Neurol* 1981; 10:222-226.
2. Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet* 1974. 6: 98-118.
3. Victor A, McKusick. Online Mendelian Inheritance in Man. National Center for Biotechnology Information. <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim>.
4. Eva Nelis, Marc Cruts, Han Wouters. Inherited. Peripheral Neuropathies Mutation Database. <http://molgen-www.uia.ac.be/CMTMutations/>
5. Dyck PJ, Chance PF, Levo RV, Carney JA. Hereditary motor and sensory neuropathies. Peripheral neuropathy, 3d ed. WB Saunders, Philadelphia 1992, pp: 1094-1136.
6. Lupski JR, Garcia CA. Charcot-Marie Tooth Peripheral neuropathies and related disorders in The metabolic and molecular basis of inherited disease, edited by Charles R. Scriver, Arthur L. Beaudet, Williams S. Sly, and David Valle, 8th ed, New York, NY, McGraw-Hill, 2001, 5759-5779.
7. Ionasescu V, Ionasescu R, and Searby Ch. Screening of dominantly inherited Charcot-Marie-Tooth neuropathies. *Muscle Nerve*. 1993a, 16, 1232-1238.
8. Wise CA, Garcia CA, Davis SN, Heju Z, Pentao L, Patel PI, Lupski JR. Molecular analyses of unrelated Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease patients suggest a high frequency of the CMT1A duplication. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 853-63.
9. Timmerman V, Raeymaekers P, De Jonghe P, De Winter G, Swerts L, Jacobs K, et. al. Assignment of the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1 (CMT1 gene to 17p11.2-p12. *Am J Hum Genet* 1990, 47 680-685
10. Reiter LT, Murakami T, Koeuth T, Pentao L, Muzny DM, Gibbs RA, Lupski JR. A recombination hotspot responsible for two inherited peripheral neuropathies is located near a mariner transposon-like element. *Nat Genet* 1996, 12(3):288-97.
11. Pentao L, Wise CA, Chinault AC, et. al. Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication appears to arise from recombination at repeat sequences flanking the 1.5 mb monomer unit. *Nature Genetics* 1992, 2 292-300
12. Han, L.-L.; Keller, M. P.; Navidi, W.; Chance, P. F.; Arnheim, N. Unequal exchange at the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A recombination hot-spot is not elevated above the genome average rate. *Hum Molec Genet* 2000; 9: 1881-1889.



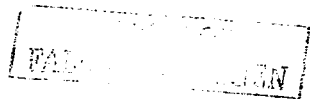
13. Roa BB, Garcia CA, Wise CA, Anderson K, Greenberg, Patel PI, Lupski JC. Gene dosage as a mechanism for a common autosomal dominant peripheral neuropathy: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A in Epstein CJ (ed) The phenotypic mapping of Down Syndrome and other aneuploid conditions (Progressive clinical biological reserch 1993 vol. 384) Wiley-Liss. New York pp:187-205.
14. Vallat JM, Sindou P, Preux PM, Tabaraud, Milor AM, Couratier P, LeGuern E, Brice A.. Ultrastructural PMP22 expression in inherited demyelinating neuropathies. *Ann-Neurol* 1996, 39(6): 813-817.
15. Suter U, Snipes GJ, Schoener-Scott R, Welcher AA, Pareek S, Lupski JR, Murphy RA, Shooter EM, Patel PI.Regulation of tissue-specific expression of alternative peripheral myelin protein-22 (PMP22) gene transcripts by two promoters. *J Biol Chem.* 1994 Oct 14;269(41) 25795-808
16. Kovach MJ, Lin JP, Boyadjev S, Campbell K, Mazzeo L, Herman K, Rimer LA, Frank W, Llewellyn B, Wang Jabs E, Gelber D, Kimonis VE. A unique point mutation in the PMP22 gene is associated with Charcot-Marie-Tooth disease and deafness. *Am J Hum Genet* 1999 Jun;64(6) 1580-93.
17. Gabreels-Festen A A W M., Bolhuis, P. A., Hoogendijk, J. E., Valentijn, L. J., Eshuis, E. J. H. M., Gabreels F J M Charcot-Marie-Tooth disease type 1A, morphological phenotype of the 17p duplication event versus PMP22 point mutations. *Acta Neuropath.* 1995, 90 645-649
18. Nicholson GA, Valentijn LJ, Cherryson AK, Kennerson ML, Bragg TL, DeKroon RM, Ross DA, Pollard JD, McLeod JG, Bolhuis PA, et al. A frame shift mutation in the PMP22 gene in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Nat Genet* 1994 Mar;6(3):263-6.
19. Valentijn LJ, Ouvrier RA, van den Bosch NH, Bolhuis PA, Baas F, Nicholson GA, Dejerine-Sottas neuropathy is associated with a de novo PMP22 mutation. *Hum Mutat* 1995,5(1):76-80
20. Valentijn LJ, Baas F, Wolterman RA, Hoogendijk JE, van den Bosch NH, Zorn I, Gabreels-Festen AW, de Visser M, Bolhuis PA. Identical point mutations of PMP-22 in Trembler-J mouse and Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1992 Dec 2(4):288-91.
21. Bell C, Hates N. Genetic aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. *Arch Dis Child* 1998 Apr;78(4) 296-300
22. Mersyanova IV, Ismailov SM, Polyakov AV, Dadali EL, Fedotov VP, Nelis E, Lofgren A, Timmerman V, van Broeckhoven C, Evgrafov OV. Screening for mutations in the peripheral myelin genes PMP22, MPZ and Cx32 (GJB1) in Russian Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients. *Hum Mutat* 2000;15(4):340-7.
23. Bort S, Nelis E, Timmerman V, Sevilla T, Cruz-Martinez A, Martinez F, Millan JM, Arpa J, Vilchez JJ, Prieto F, Van Broeckhoven C, Palau F. Mutational analysis of the MPZ, PMP22



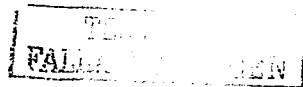
- and Cx32 genes in patients of Spanish ancestry with Charcot-Marie-Tooth disease and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum Genet* 1997 Jun;99(6):746-54.
24. Nelis E, De Jonghe P, De Vriendt E, Patel PI, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Mutation analysis of the nerve specific promoter of the peripheral myelin protein 22 gene in CMT1 disease and HNPP. *J Med Genet* 1998 Jul;35(7):590-3.
25. Sahenk Z, Chen L, Freimer M. A novel PMP22 point mutation causing HNPP phenotype: studies on nerve xenografts. *Neurology* 1998 Sep;51(3):702-7.
26. Fabrizi GM, Cavallaro T, Taioli F, Orrico D, Morbin M, Simonati A, Rizzuto N. Myelin compaction in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1A with a point mutation of peripheral myelin protein-22. *Neurology* 1999 Sep 11;53(4):846-51.
27. Meuleman J, Pou-Serradell A, Lofgren A, Ceuterick C, Martin JJ, Timmerman V, Van Broeckhoven C, De Jonghe P. A novel 3'-splice site mutation in peripheral myelin protein 22 causing hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Neuromuscul Disord* 2001 May;11(4):400-3.
28. Ekici AB, Schweitzer D, Park O, Lorek D, Rautenstrauss B, Kruger G, Friedl W, Uhlhaas S, Bathke K, Heuss D, Kayser C, Grehl H. Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies: novel mutations in the peripheral myelin genes connexin 32 (Cx32), peripheral myelin protein 22 (PMP22), and peripheral myelin protein zero (MPZ). *Neurogenetics* 2000 Sep;3(1):49-50.
29. Kovach MJ, Lin JP, Boyadjev S, Campbell K, Mazzeo L, Herman K, Rimer LA, Frank W, Llewellyn B, Wang Jabs E, Gelber D, Kimonis VE. A unique point mutation in the PMP22 gene is associated with Charcot-Marie-Tooth disease and deafness. *Am J Hum Genet* 1999 Jun;64(6):1580-93.
30. Roa BB, Dyck PJ, Marks HG, Chance PF, Lupski JR. Dejerine-Sottas syndrome associated with point mutation in the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene. *Nat Genet* 1993 Nov 5(3):269-73.
31. Ainsworth PJ, Bolton CF, Murphy BC, Stuart JA, Hahn AF. Genotype/phenotype correlation in affected individuals of a family with a deletion of the entire coding sequence of the connexin 32 gene. *Hum Genet* 1998 Aug;103(2):242-4.
32. Tyson J, Ellis D, Fairbrother U, King RH, Muntoni F, Jacobs J, Malcolm S, Harding AE, Thomas PK. Hereditary demyelinating neuropathy of infancy. A genetically complex syndrome. *Brain* 1997 Jan;120 (Pt 1):47-63.
33. Roa BB, Garcia CA, Pentao L, Killian JM, Trask BJ, Suter U, Snipes GJ, Ortiz-Lopez R, Shooter EM, Patel PI, et al. Evidence for a recessive PMP22 point mutation in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1993 Oct;5(2):189-94.



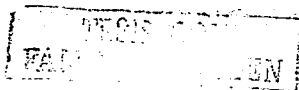
34. Ionasescu VV, Searby C, Greenberg SA. Dejerine-Sottas disease with sensorineural hearing loss, nystagmus, and peripheral facial nerve weakness: de novo dominant point mutation of the PMP22 gene. *J Med Genet* 1996 Dec;33(12):1048-9.
35. Marques W Jr, Thomas PK, Sweeney MG, Carr L, Wood NW. Dejerine-Sottas neuropathy and PMP22 point mutations: a new base pair substitution and a possible "hot spot" on Ser72. *Ann Neurol* 1998 May;43(5):680-3.
36. Simonati A, Fabrizi GM, Pasquinelli A, Taioli F, Cavallaro T, Morbin M, Marcon G, Papini M, Rizzuto N. Congenital hypomyelination neuropathy with Ser72Leu substitution in PMP22. *Neuromuscul Disord* 1999 Jun;9(4):257-61.
37. Bissar-Tadmouri N, Parman Y, Boutrand L, Deymeer F, Serdaroglu P, Vandenberghe A, Battaloglu E. Mutational analysis and genotype/phenotype correlation in Turkish Charcot-Marie-Tooth Type 1 and HNPP patients. *Clin Genet* 2000 Nov;58(5):396-402.
38. Ceuterick-de Groote C, De Jonghe P, Timmerman V, Van Goethem G, Lofgren A, Ceulemans B, Van Broeckhoven C, Martin JJ. Infantile demyelinating neuropathy associated with a de novo point mutation on Ser72 in PMP22 and basal lamina onion bulbs in skin biopsy. *Pathol Res Pract* 2001;197(3):193-8.
39. Mostacciolo ML, Righetti E, Zorzea M, Bosello V, Schiavon F, Vallo L, Merlini L, Siciliano G, Fabrizi GM, Rizzuto N, Milani M, Baratta S, Taroni F. Charcot-Marie-Tooth disease type I and related demyelinating neuropathies: Mutation analysis in a large cohort of Italian families. *Hum Mutat* 2001;18(1):32-41.
40. Bort S, Sevilla T, Garcia-Planells J, Blesa D, Paricio N, Vilchez JJ, Prieto F, Palau F. Dejerine-Sottas neuropathy associated with de novo S79P mutation of the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene. *Hum Mutat* 1998;Suppl 1:S95-8.
41. Roa BB, Garcia CA, Suter U, Kulpa DA, Wise CA, Mueller J, Welcher AA, Snipes GJ, Shooter EM, Patel PI, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Association with a spontaneous point mutation in the PMP22 gene. *N Engl J Med* 1993 Jul;329(2):96-101.
42. Ikegami T, Ikeda H, Aoyama M, Matsuki T, Imota T, Fukuuchi Y, Amano T, Toyoshima I, Ishihara Y, Endoh H, Hayasaka K. Novel mutations of the peripheral myelin protein 22 gene in two pedigrees with Dejerine-Sottas disease. *Hum Genet* 1998 Mar;102(3):294-8.
43. Silander K, Meretoja P, Juvonen V, Ignatius J, Pihko H, Saarinen A, Wallden T, Herrgard E, Aula P, Savontaus ML. Spectrum of mutations in Finnish patients with Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies. *Hum Mutat* 1998;12(1):59-68.
44. Yener GG, Guiochon-Mantel A, Obuz F, Baklan B, Ozturk V, Kovanlikaya I, Cakmur R, Genc A. Phe 84 deletion of the PMP22 gene associated with hereditary motor and sensory neuropathy HMSN III with multiple cranial neuropathy: clinical, neurophysiological and magnetic resonance imaging findings. *J Neurol* 2001 Mar;248(3):193-6.



45. Ohnishi A, Yoshimura T, Kanehisa Y, Fukushima Y. [A case of hereditary motor and sensory neuropathy type 1 with a new type of peripheral myelin protein (PMP)-22 mutation]. *Rinsho Shinkeigaku* 1995 Jul;35(7):788-92.
46. Ionasescu VV, Ionasescu R, Searby C, Neahring R. Dejerine-Sottas disease with de novo dominant point mutation of the PMP22 gene. *Neurology* 1995 Sep;45(9):1766-7.
47. Young P, Wiebusch H, Stogbauer F, Ringelstein B, Assmann G, Funke H. A novel frameshift mutation in PMP22 accounts for hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Neurology* 1997 Feb;48(2):450-2.
48. Lenssen PP, Gabreels-Festen AA, Valentijn LJ, Jongen PJ, van Beersum SE, van Engelen BG, van Wensen PJ, Boihuis PA, Gabreels FJ, Mariman EC. Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. Phenotypic differences between patients with the common deletion and a PMP22 frame shift mutation. *Brain* 1998 Aug;121 (Pt 8):1451-8.
49. Neils E, Timmerman V, De Jonghe P, Van Broeckhoven C. Identification of a 5' splice site mutation in the PMP-22 gene in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *Hum Mol Genet* 1994 Mar;3(3) 515-6.
50. Marrosu MG, Vaccargiu S, Marrosu G, Vannelli A, Cianchetti C, Muntoni F. A novel point mutation in the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Neurology* 1997 Feb;48(2) 489-93.
51. Seeman P, Mazanec R, Marikova T, Rautenstrauss B. Charcot-Marie-Tooth 1A: heterozygous T118M mutation over a GMT1A duplication has no influence on the phenotype. *Ann N Y Acad Sci* 1999 Sep 14;883:485-9.
52. Pareyson D, Taroni F. Deletion of the PMP22 gene and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Curr Opin Neurol* 1996 Oct;9(5) 348-54.
53. Pareyson D, Botti S, Sghirlanzoni A, Taroni F. PMP22 frameshift mutation and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Neurology* 1997 Nov;49(5):1478-9.
54. Navon R, Seifried B, Gal-On NS, Sadeh M. A new point mutation affecting the fourth transmembrane domain of PMP22 results in severe de novo Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Genet* 1996 May;97(5) 685-7.
55. Ohnishi A, Yamamoto T, Izawa K, Yamamori S, Takahashi K, Mega H, Jinnai K. Dejerine-Sottas disease with a novel de novo dominant mutation. *Ser* 149 Arg. of the peripheral myelin protein 22. *Acta Neuropathol (Berl)* 2000 Mar;99(3):327-30.
56. Ionasescu VV, Searby CC, Ionasescu R, Chatkupt S, Patel N, Koenigsberger R. Dejerine-Sottas neuropathy in mother and son with same point mutation of PMP22 gene. *Muscle Nerve* 1997 Jan;20(1):97-9.



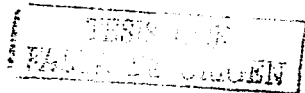
57. Numakura C, Lin C, Oka N, Akiguchi I, Hayasaka K. Hemizygous mutation of the peripheral myelin protein 22 gene associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *Ann Neurol* 2000 Jan;47(1):101-3.
58. Parman Y, Plante-Bordeneuve V, Guiochon-Mantel A, Eraksoy M, Said G. Recessive inheritance of a new point mutation of the PMP22 gene in Dejerine-Sottas disease. *Ann Neurol* 1999 Apr;45(4):518-22.
59. Bird TD, Ott J, Giblett ER. Evidence for linkage of Charcot-Marie-Tooth neuropathy to the Duffy locus on Chromosoma 1. *Am J Hum Genet* 1982. 1982 34: 388-394.
60. Hayasaka K, Himoro M, Sato W, Takada G, Uyemura K, Shimizu N, Bird T. D.; Conneally, P. M.; Chance, P. F. Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P(0) gene. *Nature Genet.* 1993; 5: 31-34.
61. Tachi N, Kozuka N, Ohya K, Chiba S, Sasaki K, Uyemura K. Expression of peripheral myelin protein zero in sural nerve of patients with Charcot-Marie-Tooth disease 1B. *Pediatr Neurol* 2001 Jan;24(1):33-5
62. Keller MP, Chance PF. Inherited peripheral neuropathy. *Semin Neurol* 1999;19(4):353-62
63. Auer-Grumbach, M.; Strasser-Fuchs, S.; Wagner, K.; Korner, E.; Fazekas, F. Roussy-Levy syndrome is a phenotypic variant of Charcot-Marie-Tooth syndrome IA associated with a duplication on chromosome 17p11.2. *J. Neural Sci.* 1998, 54: 72-75
64. Roa BB, Dyck PJ, Marks HG, Chance PF, Lupski JR. Dejerine-Sottas syndrome associated with point mutation in the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene. *Nat Genet* 1993 5 269-273
65. Ben Othmane K, Middleton L T, Loprest L J, Wilkinson, K. M., Lennon, F., Rozear, M, P. Staich, J. M., Gaskell P. C., Roses, A. D., Pericak-Vance, M. A., Vance, J. M. : Localization of a gene (CMT2A) for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2, to chromosome 1p and evidence of genetic heterogeneity. *Genomics* 1993; 17: 370-375
66. Kwon, J. M., Elliott J. L., Yee, W.-c., Ivanovich, J., Scavarda, N. : Charcot-Marie-Tooth type II locus to chromosome 3q. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 853-858.
67. Dyck, P. J.; Litchy, W. J.; Minnerath, S.; Bird, T. D.; Chance, P. F.; Schaid, D. J.; Aronson, A. E. Hereditary motor and sensory neuropathy with diaphragm and vocal cord paresis. *Ann Neurol* 1994. 35 608-615
68. Ionasescu V, Searby, C, Sheffield, V. C.; Roklina, T.; Nishimura, D.; Ionasescu, R. Autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth axonal neuropathy mapped on chromosome 7p (CMT2D). *Hum Molec Gene.* 1996. 5: 1373-1375



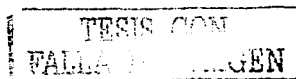
69. Ainsworth, P. J.; Bolton, C. F.; Murphy, B. C.; Stuart, J. A.; Hahn, A. F. Genotype/phenotype correlation in affected individuals of a family with a deletion of the entire coding sequence of the connexin 32 gene. *Hum. Genet.* 1998, 103: 242-244.
70. Abrams, C. K.; Bennett, M. V. L.; Verselis, V. K.; Bargiello, T. A.; Voltage opens unopposed gap junction hemichannels formed by a connexin 32 mutant associated with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2002, 99: 3980-3984.
71. Tabaraud, F.; Lagrange, E.; Sindou, P.; Vandenberghe, A.; Levy, N.; Vallat, J. M.; Demyelinating X-linked Charcot-Marie-Tooth disease: unusual electrophysiological findings. *Muscle Nerve* 1999, 22: 1442-1447.
72. Bergoffen, J.; Trofatter, J.; Pericak-Vance, M. A.; Haines, J. L.; Chance, P. F.; Fischbeck, K. H.; Linkage localization of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet* 1993 52: 312-318.
73. Gouder, R.; LeGuern, E.; Gugenheim, M.; Tardieu, S.; Maissonobe, T.; Leger, J. M.; Vallat, J. M.; Agid, Y.; Bouche, P.; Brice, A.; Clinical, electrophysiologic, and molecular correlations in 13 families with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies and a chromosome 17p11.2 deletion. *Neurology* 1995, 45: 2018-2023.
74. Felice, K. J.; Leicher, C. R.; DiMario, F. J., Jr.; Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies in children. *Pediatr Neurol* 1999, 21: 818-821.
75. Aarskog, N. K.; Vedeler, C. A.; Real-time quantitative polymerase chain reaction: a new method that detects both the peripheral myelin protein 22 duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease and the peripheral myelin protein 22 deletion in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum Genet* 2000, 107: 494-498.
76. Lopes, J.; Tardieu, S.; Silander, K.; Blair, I.; Vandenberghe, A.; Palau, F.; Ruberg, M.; Brice, A.; LeGuern, E.; Homologous DNA exchanges in humans can be explained by the yeast double-strand break repair model: a study of 17p11.2 rearrangements associated with CMT1A and HNPP. *Hum Mol Genet.* 1999, 8: 2285-2292.
77. De Jong, J. G. Y.; Over families met hereditaire dispozitie tot het optreden van neuritiden, gecorreleerd met migraine. *Psychiat Neurol. Bl.* 50: 60-76, 1947.
78. LeGuern, E.; Gouder, R.; Ravise, N.; Lopes, J.; Tardieu, S.; Gugenheim, M.; Abbas, N.; Bouche, P.; Agid, Y.; Brice, A.; A de novo case of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP) of maternal origin: a new mechanism for deletion in 17p11.2? *Hum Molec Genet.* 5: 103-106.
79. Verma RS, Babù A. *Human Chromosomes: manual of basic techniques* 1989, Pergamon Press New York, PP5-9.



80. Barker D, Wright E, Nguyen K, Cannon L, et. al. Gene for Von Recklinghausen neurofibromatosis is the pericentromeric region of chromosome 17. *Science* 1978, 262: 1100-1102.
81. Tonnies H, Stumm M, Wegner RD, Chudoba I, Kalscheuer V, Neitzel H. Comparative genomic hybridization based strategy for the analysis of different chromosome imbalances detected in conventional cytogenetic diagnostics. *Cytogenet Cell Genet* 2001;93(3-4):188-94
82. Reddy KS, Mak L. Mosaic unbalanced structural abnormalities confirmed using FISH on buccal mucosal cells. *Ann Genet* 2001 Jan-Mar;44(1):37-40.
83. Levy B, Dunn TM, Kaffe S, Kardon N, Hirschhorn K. Clinical applications of comparative genomic hybridization. *Genet Med* 1998 Nov-Dec;1(1):4-12.
84. Lopez Correa C, Brems H, Lazaro C, Estivill X, Clementi M, Mason S, Rutkowski JL, Marynen P, Legius E Molecular studies in 20 submicroscopic neurofibromatosis type 1 gene deletions *Hum Mutat* 1999;14(5) 387-93
85. Weimer J, Kiechle M, Senger G, Wiedemann U, Ovens-Raeder A, Schuierer S, Kautza M, Siebert R, Arnold N An easy and reliable procedure of microdissection technique for the analysis of chromosomal breakpoints and marker chromosomes. *Chromosome Res*. 1999;7(5) 355-62
86. Fuchs C, Liehr T, Ozybe S, Ekcici A, Grehl H, Rautenstrauss B. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a SacI polymorphism in the proximal CMT1A-REP elements may lead to genetic misdiagnosis. *Neurogenetics* 1998 Dec;2(1) 43-6
87. Estop AM, Cieply KM, Wakim A, Feingold E. Meiotic products of two reciprocal translocations studied by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1998;83(3-4) 193-8.
88. Liehr T, Grehl H, Rautenstrauss B. Molecular diagnosis of PMP22-associated neuropathies using fluorescence in situ hybridization (FISH) on archival peripheral nerve tissue preparations. *Acta Neuropathol (Berl)* 1997 Sep;94(3):266-69.
89. Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, Saucedo-Cardenas O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA, et al. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 1991 Jul 26;66(2):219-32.
90. Badano JL, Inoue K, Katsanis N, Lupski JR. New polymorphic short tandem repeats for PCR-based Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication diagnosis. *Clin Chem* 2001 May;47(5) 838-43.



91. Shaffer LG, Kennedy GM, Spikes AS, Lupski JR. Diagnosis of CMT1A duplications and HNPP deletions by interphase FISH: implications for testing in the cytogenetics laboratory. *Am J Med Genet* 1997 Mar 31;69(3):325-31.
92. Goossens M, Dozy AM, Embury SH, Zachariades Z, Hadjiminas MG, Stamatoyannopoulos G, Kan YW. Triplicated alpha-globin loci in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980 Jan;77(1):518-21.
93. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Gutkin M, Fallo F, Gill JR Jr, Feld L, Ganguly A, Laidlaw JC, et al. Hereditary hypertension caused by chimaeric gene duplications and ectopic expression of aldosterone synthase. *Nat Genet* 1992 Sep;2(1):66-74
94. Katsanis N, Ansley SJ, Badano JL, Eichers ER, Lewis RA, Hoskins BE, Scambler PJ, Davidson WS, Beales PL, Lupski JR. Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science* 2001 Sep 21;293(5538):2256-9
95. Nelis E, Timmerman V, De Jonghe P, Vandenberghe A, Pham-Dinh D, Dautigny A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Rapid screening of myelin genes in CMT1 patients by SSCP analysis: identification of new mutations and polymorphisms in the P0 gene. *Hum Genet* 1994 Dec;94(6):653-7
96. Olivieri NF. The beta-thalassemias. *N Engl J Med* 1999 Jul 8;341(2):99-109.
97. Jahss MH. Evaluation of the cavus foot for orthopedic treatment. *Clin. Orthop* 1983 Dec; (181): p52-63



AGRADECIMIENTOS:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al Centro Nacional de Rehabilitación.

Al Hospital General de México.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

FALLA DE ORIGEN