

00524
55



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA
DUPLICACIÓN DEL GEN PMP-22 EN PACIENTES
CON CMT-1A POR TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN IN
SITU FLUORESCENTE**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
GALVEZ / ROSAS ARTURO



MÉXICO, D.F.

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2003

1



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Arturo Gálvez Rosas

FECHA: 06 - Junio - 03

FIRMA: [Firma]

JURADO ASIGNADO:

PROFESORES

PRESIDENTE **MARISOL LÓPEZ LÓPEZ**

VOCAL **EVA DELIA CALDERON GARCIA DUEÑAS**

SECRETARIO **NORBERTO LEYVA GARCIA**

1er SUP. **IGNACIO CAMACHO ARROYO**

2do SUP. **EDUARDO CUMMING GONZALEZ**

Sitio donde se desarrolló el tema: CENTRO NACIONAL DE REHABILITACION-ORTOPEDIA


M en C. Norberto Leyva García
nombre y firma del asesor


Arturo Gálvez Rosas
nombre y firma del sustentante

Dedicatoria.

A mi Mamá Ma. Elena, por su cariño y comprensión.

A mi hermano Pablo, por su gran ejemplo y apoyo.

A mi hermano Jaime, por sus consejos que me han orientado durante toda mi carrera.

A mi Esposa Laura, por todo su amor y cariño que me ha brindado.

A mis hijos Jorge A. y David A., por ser la motivación de mi vida.

INDICE.

1. - Antecedentes.	7
2. -Marco teórico	8
2.1. - Definición de CMT.	8
2.2. - Estudios electrofisiológicos e histopatológicos de CMT.	8
2.2.1. - CMT1	8
2.2.2. - CMT2	8
2.3. - Estructura microscópica del nervio periférico	9
2.3.1. – Estructura histológica, fisiológica y expresión génica de las fibras nerviosas del nervio periférico	10
2.4. - Modo de herencia.	14
2.4.1. - Autosómica dominante	14
2.4.1.1. - CMT1A	14
2.4.1.2. - CMT1B	14
2.4.1.3. - CMT1C	14
2.4.2. - Autosómica recesiva	14
2.4.3. - Ligada al X	14
2.4.4. – Deleción HNPP	15
2.5. - Cuadro clínico.	16
2.5.1. – CMT	16
2.6. - Mecanismo mutacional.	16
2.6.1. - Mutaciones puntuales.	16
2.6.2. - Rearreglos cromosómicos	17

2.7. – Estructura y función de proteínas.	18
2.7.1. – PMP 22	18
2.7.2. – Po	19
2.7.3. – Conexina 32	20
2.8. – <i>Hotspot</i> en CMT.	21
2.9. – Elemento marinerano parecido a los transposones cercano al <i>Hotspot</i> .	22
3. – Métodos de diagnóstico molecular. (FISH)	23
3.1. – Hibridación <i>in situ</i> fluorescente	24
3.1. – Temperatura y concentración de sales	25
3.2. – Formamida	25
3.3. – DNA Bloqueante	26
3.4. – DNA Portador	26
3.5. – Moléculas intermoleculares	26
3.6. – Sondas	26
3.7. – Marcado de la sonda	27
3.7.1. – <i>Random Primed</i>	27
3.7.2. – <i>Nick Translation</i>	27
3.7.3. – PCR	28
3.8. – Fluorocromos	29
3.8.1. – Digoxigenina	29
3.8.2. – Biotina	30
3.8.3. – Fluoresceína.	30

3.9. – Métodos no radioactivos de hibridación.	31
3.9.1. – Directo.	31
3.9.2. – Indirecto.	31
4. - Justificación.	33
5. - Planteamiento del problema.	34
6. - Hipótesis.	35
7. – Objetivos.	36
8. - Materiales y Métodos.	37
9. - Resultados.	46
10. - Discusión.	52
11.- Conclusión.	53
11. - Bibliografía.	55

ANTECEDENTES HISTORICOS.

En 1886 los médicos franceses Jean Martin Charcot, Pierre Marie y en forma independiente, el inglés Howard Henry Tooth, describieron un padecimiento que afecta al músculo de las extremidades inferiores en forma progresiva, el cual lleva sus nombres Charcot-Marie-Tooth (CMT) (1,2).

Las primeras observaciones de este síndrome las realizó Friedreich en 1873 e incluye reportes patológicos que indican la presencia de una neuritis intersticial periférica y Ormerod en 1884 donde describe a dos niños del Hospital Nacional de Parálisis y Epilepsia (2,3). En 1893 Dejerine & Sotas describen una forma más severa de atrofia muscular peroneal con pérdida de la función muscular progresiva generalizada, pérdida sensorial severa y ataxia de miembros. Para 1954 Davies revisa la neuropatía hereditaria con predisposición a parálisis por presión (3,4). La descripción de CMT tuvo un período largo de confusión, revisado por Harding y Thomas en 1980, debido al uso de terminologías ambiguas, que incluyen neuropatía hipertrófica, síndrome de Dejerine-Sottas y el síndrome de Roussy-Levy (considerada como una forma frustrada de ataxia Friedrich), así como CMT o atrofia muscular peroneal. Parte de esta confusión refleja la heterogeneidad genética del padecimiento (4).

MARCO TEORICO

DEFINICION DE CMT.

El padecimiento de Charcot-Marie-Tooth (CMT) es una atrofia progresiva lenta de los músculos en los miembros distales, es uno los desórdenes hereditarios más comunes del sistema nervioso periférico, afectando a 1:2500 personas (4,5). La enfermedad se hace evidente durante la segunda década de la vida. A pesar de que el cuadro clínico demuestra una amplia variabilidad, la herencia es de tipo mendeliano (4).

BASES ELECTROFISIOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS DE CMT.

Sobre la base de fundamentos electrofisiológicos CMT se puede dividir en dos tipos; la forma desmielinizante o tipo 1, que involucra una disminución moderada a severa de la velocidad de conducción motora (VCM), usualmente menor a 40m/seg. . la velocidad de conducción motora (VCM) de los nervios peroneal y ulnar en estos pacientes es en promedio menos de la mitad que los valores normales. La mayoría de los pacientes con CMT tienen al nacer la VCM normal y no hay correlación entre el grado de anomalías de VCM y la severidad del fenotipo (6,7).

En el tipo 2, la anomalía primaria parece ser más nerviosa que glial, no se observan bulbos de cebolla y la VCM es ligeramente reducida o normal, por otra parte se observan señales de amplitud disminuidas. La electrofisiología representa una importante herramienta diagnóstica para la enfermedad de CMT (4,6).

La desmielinización y gliosis, frecuentemente están asociadas con un alargamiento del nervio periférico, junto con una disminución de las fibras de mielina, en cortes histopatológicos se observan formas de bulbos de cebolla, la uniformidad de los segmentos nerviosos proximal distal se enfocan a las células de Schwann (8).

ESTRUCTURA MICROSCOPICA DEL NERVIOS PERIFERICO.

En cortes transversales de un nervio periférico de gran calibre puede observarse que hay una disposición de tejido conectivo en forma aproximadamente tubular que incluye todo el nervio, y recibe el nombre de epineuro. La pared del tubo del epineuro no es muy gruesa y no suele ser tan resistente como las paredes de los tubos menores de tejido conectivo que se hallan en su interior. Los tubos menores tienen paredes de tejido conectivo relativamente denso, éste es el llamado perineuro. Cada tubo de perineuro contiene un número elevado de fibras nerviosas. Pero cada fibra nerviosa dentro del tubo perineural está incluida en una capa fina de tejido conectivo; el tejido conectivo de estos tubos delicados que rodean cada fibra nerviosa recibe el nombre de endoneurio (8,9).

Los nervios pequeños carecen de epineuro. Un nervio menor está formado por un tubo de perineuro dentro del cual hay tubos de endoneuro conteniendo cada uno una fibra nerviosa (9,10).

ESTRUCTURA HISTOLOGICA, FISILOGIA Y EXPRESION GENICA DE LAS FIBRAS NERVIOSAS DE LOS NERVIOS PERIFERICOS.

Dentro de su vaina de endoneuro de tejido conectivo, cada fibra nerviosa del sistema nervioso periférico está cubierta de una vaina protoplasmática muy delgada denominada neurolema o vaina de Schwann. Las células que forman esta vaina provienen de células neuroectodérmicas que crecen a lo largo de las fibras nerviosas, junto con ellas, cuando van siendo impulsadas saliendo de las crestas nerviosas por el tubo neural (10). En muchas fibras nerviosas hay una capa de mielina entre las fibras nerviosas, y el neurolema de bastante espesor; por lo tanto, tales fibras reciben el nombre de fibras mielínicas o mielinizadas. Otras fibras las cuales tienden a ser menores, están cubiertas de muy poca mielina, reciben el nombre de fibras no mielínicas y en grupos de hasta una docena o más quedan incluidas en el citoplasma de la misma célula de Schwann (10,11).

Específicamente, la mielina actúa como un aislante eléctrico para la propagación de los impulsos eléctricos a lo largo de la longitud del axón por saltos de conducción (10).

La mielina de las fibras mielínicas no es continua; se interrumpe periódicamente por constricciones denominadas nodos de Ranvier. En el ámbito de estos nodos no hay mielina y tanto la vaina del neurolema como la fibra nerviosa penetran profundamente hacia la fibra nerviosa, sin llegar a cubrirla por completo (11).

Las fibras nerviosas no mielínicas, sin vainas de mielina y sin nodos de Ranvier, no conducen impulsos nerviosos tan rápidamente como las fibras mielínicas (11,12).

Cuando un nodo de Ranvier se despolariza debido a un impulso nervioso, la superficie interna de la membrana del axón a nivel de dicho nodo tiene una carga positiva mayor que la

superficie interna del axón que en el nodo de Ranvier vecino, de manera que se desplaza la corriente al alcanzar otro nodo despolarizado (13).

Por lo tanto, en fibras mielínicas la onda de despolarización salta, a lo largo de las fibras nerviosas de un nudo al siguiente, este es el motivo de que la conducción sea tan rápida en las fibras mielínicas. Parece que las diferencias de potencial que genera la corriente entre nodos de Ranvier vecinos no serían suficientemente grandes para que uno despolarizado, causara despolarización del próximo si los nodos estuvieran muy apartados entre sí. Los nodos de Ranvier nunca están separados por más de 1mm de distancia. La rapidez de la transmisión nerviosa a lo largo de una fibra varía con el diámetro de la misma; cuando más voluminosa, más rápidamente conduce (14).

La mielina entre las constricciones de Ranvier está rota por pequeñas incisuras o hendiduras que se extienden penetrando desde la superficie, son las llamadas hendiduras de Schmidt-Lantermann, y los segmentos entre ellas se denominan segmento de Schmidt-Lantermann (14).

La formación y estructura fina de las vainas de mielina es de citoplasma de la célula de Schwann que rodea un axón. El estado de desarrollo en premielinización, es un prerequisite para iniciar la mielinización y es regulado a través de interacciones de célula de Schwann-axón, y secuencias de eventos genéticamente programados por la sobre regulación de expresiones de genes específicos mielínicos, *Krox 20* y *Oct 6* que son importantes componentes de la transición programada de la promielinización al estado de mielinización del desarrollo de las células de Schwann, porque ambos *Krox 20* y *Oct 6* son factores de transcripción, su rol en la transición de promielinización al estado de mielinización del desarrollo debe ser activado por la transcripción de genes mielínicos específicos,

sugiriendo que la regulación de expresión genes específicos mielínicos ocurre principalmente a nivel transcripcional (15).

En el sistema nervioso periférico, *Krox 20* se expresa en forma importante en células Schwann mielínicas, estos RNAm se acumulan en paralelo con otros productos importantes de transcritos de genes mielínicos, la expresión de *Krox 20* también requiere la interacción de células de Schwann-axonales. Experimentalmente se ha visto que en la sección del nervio la expresión se ve abolida y también durante la reinervación. Interesantemente el inicio de la expresión de *Krox 20* se da en las células de Schwann después de *Oct 6*, sugiriendo que *Krox 20* actúa como un paso en el desarrollo de las células de Schwann río abajo de *Oct 6* (11,12,15). *Oct 6* también llamado SCIP/T es expresado en altas cantidades en células de Schwann-promielinizantes y posteriormente es inactivado. *Oct 6* es expresado en células de Schwann antes de *Krox 20*, estos transcritos no se traslapan sugiriendo que *Oct 6*, está involucrado en un paso inicial de la vía de mielinización, el modo de expresión de *Oct 6* depende de la interacción entre las células de Schwann-axonales: *Oct 6* se vuelve a expresar en el nervio adulto después del daño nervio cuando las células de Schwann recubren los axones. La expresión durante el desarrollo y la re-inervación pueden ser bloqueadas también por axotomía (9,14,15). En adición, la des-regulación de *Oct 6* antes de la mielinización también requiere la presencia de axones, en la ausencia de *Oct 6*, las células de Schwann son llevadas al estado de desarrollo promielinizante y eventualmente al estado mielinizante. Finalmente *Oct 6* no es necesario para la transición del estado pro al mielinizante del desarrollo de las células de Schwann, pero es requerido para la perfecta sincronización de esta transición (10,15).

Cuando la célula de Schwann empieza a envolver al axón, la membrana que reviste una parte del surco entra en contacto con la membrana celular que reviste la otra parte de

dicho surco. Estas dos membranas llegan a reunirse y cuando la célula sigue girando alrededor del axón constituyen una serie de anillos formados por líneas dobles. Entre los anillos dobles vecinos al principio hay citoplasma. En consecuencia, la vaina de mielina está constituida por anillos de membrana celular de dos capas cada una (13).

Se sugiere que las células de Schwann tienen una profunda influencia en los axones por que afectan la densidad del neurofilamento, la fosforilación del mismo, lento transporte y el calibre axonal. Amplias evidencias demuestran que los axones pueden modular la producción de mielina vía las células de Schwann (10).

Aunque la regulación de la mielinización es muy compleja, un punto importante de este proceso durante el desarrollo y remielinización, es la regulación de los genes transcripcionales mielínicos. Los genes transcripcionales mielínicos pueden ser modulados a través de la actividad de al menos tres señales de transducción; A.-) La activación de la interacción entre el axón y las células de Schwann, lo cual es requerido para establecer el estado de promielinización del desarrollo de las células de Schwann, la transición al fenotipo mielinizante, y mantener este fenotipo. Los cambios en la expresión de genes mielínicos producidos por esta ruta pueden también alterar la disponibilidad de la respuesta de células de Schwann a señales axonales, conduciendo hacia los procesos de desarrollo o remielinización. B.-) El retículo endoplásmico el cual es sensible al colesterol y los pliegues membranales proteicos, es requerido para la coordinación de la biosíntesis de proteínas y lípidos. C.-) La expresión de PO la cual se encuentra regulada por el ensamblado de la compactación de la mielina (14,15).

MODO DE HERENCIA Y MAPEO CROMOSOMICO.

A pesar de la heterogeneidad genética, la forma de herencia más frecuente es autosómica dominante que representa al tipo 1. Para esta categoría se involucran a tres loci genéticos; en el cromosoma 17 para *CMT-1A*, cromosoma 1 en *CMT-1B* y para *CMT-1C* en el cromosoma 10 *EGR2* (16,17). La forma axonal de *CMT-2* es menos frecuente que el tipo 1 y también es autosómica dominante, los hallazgos histológicos son disminución del número de axones mielinizados sin una evidente significancia de demielinización o remielinización y un incrementado número de tomaculae en preparaciones de nervio, se tienen tres loci identificados, en el cromosoma 1p35-p36 en *CMT2A*, en el cromosoma 3q13-q22 en *CMT2B*, aun no identificado para *CMT2C*, en el cromosoma 7p11.2 en *CMT2D*, y finalmente *CMT2E* no se tiene identificado (20,21). La forma autosómica recesiva de *CMT* es relativamente rara, es genéticamente heterogénea y ha sido recientemente mapeado en el cromosoma 5q23-q33 para *CMT4C*, en el cromosoma 8q13-q21.1 para *CMT4A*, en el cromosoma 11q23 para *CMT4B* (18,19).

Clínicamente *CMT* ligado al X es parecido a *CMT-1*, el gen de la conexina 32 está mapeado en el brazo largo del cromosoma X, y es la segunda causa más común de neuropatía hereditaria después de *CMT1A*. (22,23,24)

Posiblemente el aislamiento de todos estos genes y sus proteínas nos puedan dar una mejor idea para entender las propiedades estructurales y funcionales del nervio periférico.

Existe una gran variedad de *CMT* desde el punto de vista clínico por ejemplo: la forma severa de neuropatía es el síndrome de Dejerine-Sottas la cual es una rara enfermedad con presentación en la infancia y las velocidades de conducción son menores de 10m/seg

(25,26). Existe otra entidad que es la neuropatía hipomielizante congénita y finalmente está el término que se refiere a la neuropatía hereditaria con predisposición a provocar parálisis por presión, (*HNPP*) la cual es una variante alélica de *CMT1A* provocada por delección (27).

La delección en 17p11.2 está asociada con un fenotipo diferente, neuropatía tomaculous o neuropatía hereditaria con predisposición a provocar parálisis por presión,(1,2) La *HNPP* es autosómica dominante, presenta en un inicio debilidad y parálisis muscular provocado por una compresión o trauma leve, el inicio de la enfermedad es en la niñez o adolescencia, la velocidad de conducción está ligeramente disminuida y muestra segmentos nerviosos desmielinizados y remielinizados, creando aumentos de la cubierta de mielina (28,29).

Se implican a tres genes específicos en el espectro clínico de las neuropatías periféricas, el gen de la proteína mielínica periférica de 22 Kd (*PMP22*) éste involucra a tres enfermedades, *CMT-1A*, *DSS*, *HNPP*, el gen de la proteína mielínica cero (*MPZ*) presente en *CMT-1B*, *DSS*, *CHN* y finalmente el gen de la *conexina 32*(*Cx32*) implicado en *CMT-X* (4).

CUADRO CLINICO.

La enfermedad de CMT inicia primero en los pies y piernas, los síntomas son debilidad de los músculos distales que se detectan inicialmente como una anomalía en la marcha (*steppage* o en equino), calambres frecuentes, en el examen físico presentan deformidades de los pies, incluyendo pie cavo o equino varo y una apariencia de botella de champagne invertida en los miembros inferiores (30). Los reflejos tendinosos están ausentes o disminuidos. Los síntomas sensoriales son menores y estos son reportados por los pacientes como disminución de la sensación sobre el pie, esto puede producir callosidades y menos frecuente úlceras, los cuales se desarrollan sobre los puntos de presión. Más tarde, los pacientes experimentan debilidad de los músculos intrínsecos de la mano, que nos llevan a una apariencia de la mano en garra (31).

MECANISMOS MUTACIONALES.

Existen dos mecanismos de mutación descritos, las mutaciones puntuales y las duplicaciones. En *CMT-1A* en el brazo corto del cromosoma 17 en la región 17p11.2-p12 existe una duplicación submicroscópica de 1.5 Mb. en un alelo creando un complemento trisómico parcial, con dos copias en el cromosoma anormal y una tercera en el cromosoma normal, el rearreglo es de alrededor del 70 % en los casos hereditarios y el 90 % de casos esporádicos (32). En aproximadamente el 85 % de los casos de pacientes con *HNPP*, son en la misma región, el paciente es hemigigote a este *locus* y solo tiene una copia en el cromosoma normal (29).

La duplicación contiene los genes *HREP*, *COX10*, *RPL9* que codifica la proteína L9 ribosomal 60S, *RMSA* gen del huso mitótico y se contempla que esta región contiene probablemente de 30 a 50 genes informacionales, basado en el tamaño, por lo tanto la función de los productos de uno o más de estos genes pueden ser alterados a través del incremento de dosis, el gen *PMP22* está dentro de la región de 1.5 Mb. y se ha postulado como el factor etiológico de la enfermedad, es probable que sea debido a la sobre expresión en CMT-1A y a la baja expresión en HNPP (33).

La región de 1.5 Mb. está flanqueada por dos regiones casi idénticas una proximal y otra distal que constan de alrededor 24000 pb. estas secuencias repetidas de DNA son 98.7% semejantes una de la otra. (*CMT-1A REP*) (34).

Se ha sugerido que la presencia de los *CMT-1A REPs* en esta región *CMT1A* y la Deleción de *HNPP*, estén relacionados con la duplicación provocado por un entrecruzamiento desigual. La idea básica es que ocurre un error durante la meiosis, donde las regiones del genoma de los cromosomas 17, pueden cambiar un segmento amplio de DNA. Tales recombinaciones son frecuentes, ocurren en promedio una vez por meiosis en cada brazo corto del cromosoma 17 (35,36). El par cromosómico humano es homólogo en 99.9%, difiriendo únicamente en un polimorfismo alrededor de una vez en cada mil nucleótidos (37,38). Durante el entrecruzamiento del cromosómico 17, la REP proximal de un cromosoma permite acoplarse con el REP distal del otro, debido a la homología el par correcto, pero el resto de la región se encuentra mal alineada (38,39). En este evento, el intercambio meiótico es desigual, un cromosoma recibe una duplicación en tándem de la región entre REPS y el otro es dejado sin copia (figura 1) (39,40).

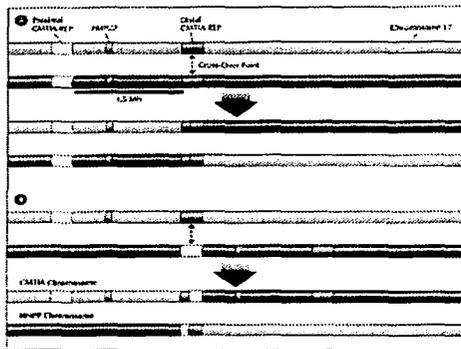


FIGURA 1. —Esquema donde se representa A.- El entrecruzamiento normal entre los REPs proximal y distal. B.- El entrecruzamiento desigual causando el cromosoma CMT1A (4)

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE PROTEÍNAS.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

PMP-22

La secuencia del gen *PMP-22* humano predice una proteína de 160 aminoácidos, con un peso molecular 22 kDa, y con cuatro dominios transmembranales, la expresión de *PMP-22* se da principalmente en la mielina compactada del nervio periférica, observándose una regulación en el nervio distal dañado que después regenera el axón, esto sugiere que el axón regula al gen en las células de Schwann (2,4).

La función precisa de *PMP-22* aún no está clara pero se considera que actúa en el mantenimiento de la integridad estructural de la mielina, muy importante en la regulación del ciclo celular y funcionando como una molécula de adhesión. Recientemente se ha demostrado que la regulación es por dos promotores alternativos, siendo tejido específicos; A.-) Es predominante en el nervio periférico y B.-) En tejido extraneural como pulmón, corazón e intestinos (9,40).

Po. (MPZ)

CMT-1B está ligado al locus del grupo sanguíneo Duffy en el brazo largo del cromosoma 1. El brazo largo (específicamente 1q21.2-q23) contiene al gen de la proteína mielínica cero (*MPZ*) de 28 kda, el cual se compone de seis exones (2,4). Esta proteína contiene pliegues, es un miembro de la súperfamilia de las inmunoglobulinas y consta de un dominio extracelular parecido a una inmunoglobulina, un dominio transmembranal y un dominio citoplásmico, que solo se expresa en las células de Schwann (6,9). Las principales mutaciones en el gen *Po* son en los exones 2 y 3 que codifican para los dominios extracelular y transmembranal de la proteína. Muchos de los pliegues de la molécula glicosilados están en el dominio extracelular que dan sus propiedades adhesivas para compactación de la mielina (41).

Las formas homotetraméricas se entrelazan con idénticos tetrámeros en oposición en las membranas de las células de Schwann, esto sugiere que *MPZ* es adhesiva para la envoltura de la cubierta de mielina (1,2,41).

Conexina 32.

El gen *CMT-X* está localizado en la región Xq13.1 que contiene al gen *Cx32* que codifica para una proteína de 32 kDa que es una proteína de unión llamada conexina 32, expresada en múltiples tejidos, la proteína se organiza en un grupo hexagonal el cual forma un canal en la membrana. La conexina tiene cuatro dominios transmembranales, dos dominios extracelulares, cada dominio extracelular tiene tres residuos de cisteína altamente conservados y se piensa que estabilizan la estructura terciaria de la molécula a través de la formación de unión de bisulfitos y un dominio intracelular, así como los dominios N y C terminal, la alfa hélice del tercer dominio transmembranal forman el poro central, con residuos polares alineados en la pared del poro, el diámetro del canal es 1.2 nm, ésta es conectada con otro hexámero de *Cx32* en la superficie de la célula adyacente completando el canal para permitir el paso de proteínas, ácidos nucleicos, iones y pequeñas moléculas (1,2,24).

Se ha postulado que la brecha de unión intercelular está involucrado, en numerosos procesos, incluyendo cooperación metabólica, sincronización intercelular, y control del crecimiento del nervio periférico durante el desarrollo (3,4).

La diferencia de *PMP22*, *MPZ*, es que aparecen por toda la cubierta de mielina y *Cx32* es encontrada únicamente en los nodos de Ranvier y Schmidt Lantermann. (22,23)

HOTSPOT EN CMT.

El genoma humano es rico en secuencias repetidas. Un ejemplo son las secuencias *Alu* que tienen 300 pb. de largo y se encuentran de 100 a 1000 veces en todo el genoma. Precisamente dentro de *CMT-1A* REPs existe una alta homología entre los 24000 pb. (42,43)

El REP distal tiene un sitio *EcoRI* que no está presente en el REP proximal, mientras que el REP proximal tiene el sitio *SacI* que no contiene el REP distal. Si el punto de ruptura fuera entre estos dos marcadores, el recombinante REP en la duplicación cromosómica 1.5 Mb tendrá una distancia 3.2 Kb. y es un fragmento intermedio entre la región proximal y distal del entrecruzamiento (37). En la delección recíproca del cromosoma el punto de entrecruzamiento puede ser en el fragmento *Eco RI* a *Eco RI* de 7.8 Kb. Posterior a la secuencia de este fragmento de DNA reveló un sitio *NsiI* en el REP proximal que no está en el REP distal, el entrecruzamiento entre *Eco RI* a *NsiI* tiene un lugar el punto de ruptura en un espacio únicamente de 1.7 Kb. (Fig. 2) (43).

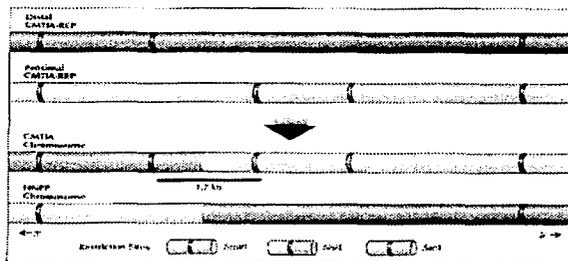


FIGURA 2. —Esquema donde se ejemplifica el sitio de restricción de 1.7 kb. en el sitio de recombinación.(4)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ELEMENTO MARINERO PARECIDO A LOS TRANSPOSONES CERCANO AL HOTSPOT.

Ciertos datos sugieren que probablemente existe una señal dentro o cercana al sitio de intercambio de recombinantes de homología para ocurrir preferentemente dentro de la región de 1.7 Kb, (44,45) ciertas evidencias sugieren que hay un elemento parecido a un transposón llamado MITE cercano al *Hotspot* de recombinantes de homología entre los *CMT1A*-REPs (46,47). Se predicen tres exones en ambas regiones tanto en la de 7.8 para el *CMT1A*-REP proximal y en la región de 1.8 para el *CMT1A*-REP distal, uno de estos exones demuestra homología a nivel de aminoácidos de la región conservada de varios transposones de insectos. (MITE; elemento Marino del Transposón de insectos) (48,49).

El análisis de la secuencia determinó que el repetido está flanqueado por secuencias *ALU* invertidos, la secuencia *ALU* está presente en la porción centromérica de los repetidos *CMT1A*-REP proximal y distal y así en la porción telomérica del repetido distal. La secuencia *ALU* truncada está presente en la región telomérica del repetido proximal sugiriendo que el repetido *CMT1A*-REP distal es la copia progenitora (50).

La enzima transposasa del elemento de transposición corta estos sitios blanco potenciales en la región 3' terminal de MITE ó en uno de los 88 dinucleótidos TA repetidos en esta región, el cual es el sitio preferido para inserciones de estos elementos, entre los sitios *EcoRI* y *NsiI* que flanquean el *Hotspot* (51). El doble rompimiento de la cadena podría ser la señal para iniciar el intercambio de cadenas que resulta en un *Hotspot* de homología de recombinación en humanos similares a los *Hotspot* observados alrededor de sitios blancos de elementos de *Drosophila* (48,52).

METODOS DE DIAGNOSTICO.

La duplicación no es visible por análisis estándar de cromosomas o por laminillas de cromosomas en metafase por técnicas de citogenética de alta resolución, (6,35,42) sin embargo, los pacientes con CMT1A pueden ser detectadas por análisis *Southern blot* que detecta diferentes dosis de alelos, la amplificación de un polimorfismo repetido (GT)_n por PCR para detectar tres alelos (53,54), la detección de nuevos fragmentos de unión usando la electroforesis en campos pulsados(PFGE) y la hibridación *in situ* fluorescente en núcleos en interfase para detectar duplicaciones (55).

La hibridación *in situ* fue primero descrita por Pardue y Gall en 1969 y por John en forma independiente, usando glándulas salivares de *Drosophila*. (57,58)

A mediados de los 1970 se desarrollaron métodos para detectar la presencia de segmentos de DNA y RNA por Southern y Alwine respectivamente. (58)

Desde el desarrollo de la hibridación *in situ* fluorescente por Landegent en 1984 y por Pinkel en 1986, los marcadores fluorescentes han remplazado a los radioactivos. Los marcadores fluorescentes tienen varias ventajas sobre las marcas con isótopos, incluyendo rapidez para el análisis microscópico, sensibilidad, estabilidad, seguridad, disminución de tiempo de hibridación y la obtención de múltiples marcas (59).

HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE

La hibridación de ácidos nucleicos es el método más poderoso para detectar y cuantificar secuencias de DNA y RNA específicas (57). Con ella es posible detectar secuencias de ácidos nucleicos en el interior de las células, en compartimentos subcelulares, (mitocondrias, cloroplastos, núcleo, nucleolo) y aún subnucleares, y/o en extendidos de cromosomas metafásicos (58). Todas las metodologías que emplean el proceso de hibridación de ácidos nucleicos comprenden básicamente el uso de un fragmento de DNA de una sola cadena marcado específicamente *in vitro* (sonda), la cual reacciona y se une con su cadena de DNA complementaria (59).

La reacción de hibridación es dinámica donde la desnaturalización de la secuencia blanco y la cadena complementaria sencilla de DNA se alinean formando una cadena doble estable entre moléculas híbridas. Durante la hibridación, las interacciones rápidas y estables que ocurren entre el blanco y la sonda forman cuatro tipos de dúplex: Blanco: Blanco, Sonda: Sonda, híbridos estables específicos, e híbridos inespecíficos. Los primeros tres tipos son más estables y sus dúplex pueden resistir más condiciones de rigurosidad durante la hibridación y subsecuentes lavados debido a su alto grado de complementariedad. Los dúplex Sonda: Sonda o Blanco: Blanco son no detectables o deseables porque el complejo no está unido a la laminilla y es removido durante los pasos de lavado en el primero, en el segundo caso no es marcado y no se observa, las interacciones inespecíficas son removidas generalmente durante los lavados de gran rigor (60).

La teoría cinética molecular determina los parámetros de los procesos de hibridación. La concentración de la sonda y blanco, temperatura, concentración de sales y pH, determinan significativamente la relación de alineamiento.

TEMPERATURA Y CONCENTRACIÓN DE SALES.

La hibridación entre la sonda y el blanco ocurre justo debajo de su punto de fusión (T_m). La T_m de un dúplex dado generalmente depende de tres factores: composición de bases, longitud, y concentración de sales. Esta relación es expresada en una ecuación que predice la T_m para una cadena dúplex.

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 16.6 \log M + 0.41 (\%G+C) + [81.5 - (820/l) - 1.2 (100 - h)]$$

Donde M es la concentración de cationes monovalentes, $\% G+C$ es la composición de bases, l es la longitud del dúplex, y h es el porcentaje de homología inter cadenas.

La temperatura de fusión del dúplex es también en función de la concentración de sales. SSC en la mezcla de hibridación estabiliza pares de bases no complementarias. Los cationes monovalentes Na^+ interacciona electrostáticamente con las cargas negativas de los fosfatos, que causan resistencia de los ácidos nucleicos. Neutralizando las cargas de la cadena de oligonucleotidos, la repulsión entre blanco y sonda es minimizada, así se estabiliza el híbrido. (59)

FORMAMIDA.

La formamida es usada durante la hibridación porque ésta desestabiliza las uniones de hidrógenos a través de pares de bases y bajando la temperatura de fusión del blanco y sonda. Cada porcentaje de formamida baja la T_m 0.7 $^{\circ}\text{C}$, la formamida desestabiliza secuencias ricas-AT desproporcionadamente más que híbridos ricos-GC. La desventaja de la formamida es que el tiempo de reacción de hibridación se incrementa aproximadamente tres veces. (61)

DNA BLOQUEANTE.

El DNA bloqueante es frecuentemente usado para reducir hibridaciones no específicas de la sonda a DNA no blanco. Éste consiste de secuencias repetitivas o extractos geonómicos de tamaño entre 400 pb. y 1kb. (61)

DNA PORTADOR.

El esperma de salmón es frecuentemente usado durante la hibridación para reducir el fondo, se asocia con sitios no biológicos en la ausencia de blanco, el tamaño es de 400bp aproximadamente. (61)

MOLÉCULAS INTERCALARES.

El dextrán sulfato, la gelatina o el suero fetal bovino, facilitan los procesos de hibridación disminuyendo los espacios libres en la reacción, ya que son muy hidrofílicos, y así los ácidos nucleicos tiene menos acceso al agua. (61,62)

SONDAS.

Las sondas pueden ser de longitud entre 250 pb. y 1 kb, fragmentos de DNA. Entre ellas están los oligonucleótidos, fragmentos de DNA generados por PCR, RNA antisentido o RNA sense producidos por transcripción *in vitro*.(57,58)

MARCADO DE LA SONDA

Las marcas se pueden adicionar por diferentes procedimientos como; *random primed*, *nick translation*, PCR, 3' terminal *marcando/tailing*, o transcripción *in vitro*.

RANDOM PRIMED

Las sondas preparadas por esta técnica se usan generalmente para aplicaciones blot por la alta incorporación de nucleótidos y la alta producción de sonda marcada.

En la reacción de *random primed*, el DNA molde es desnaturalizado y se alinea el oligonucleótido iniciando de 3'-OH. El tamaño de la sonda es de alrededor de 200 a 1000 pb., la reacción *random primed* puede producir de 30-70 ng (10 ng DNA molde y 1 h incubación) para 2.10-2.65 ug (por 3 ug molde y 20 h incubación) de DNA marcado no radiactivamente. (58)

NICK TRANLATION.

En la reacción de *nick translation* el DNA molde puede estar superenrollado o lineal, después el DNA es cortado con DNAsa 1, la actividad de la exonucleasa DNA polimerasa 5'-3' se extiende sobre las muescas o huecos, así la polimerasa reemplaza el nucleótido incidido con unos marcados. La reacción produce un marcado óptimo después de 60 a 90 min. El tamaño de la sonda después de la reacción es alrededor de 200 a 500 pb. (57,58)

PCR

Las sondas pueden ser creadas por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la PCR, dos oligonucleótidos hibridan las cadenas de DNA en forma opuesta y flanquean una secuencia blanco específica. Así una polimerasa termoestable (tal como la *Taq* DNA polimerasa) elonga los dos primers, en una secuencia de ciclos repetidos (desnaturalización, alineamiento del oligonucleótido y extensión de los mismos) resultando en una acumulación exponencial de copias de la secuencia blanco (Alrededor de un millón de copias en 20 ciclos). La incorporación de nucleótidos marcados durante la PCR puede producir grandes cantidades de sonda marcada con mínimas cantidades ya sea de plásmido o de DNA genómico. La extensión de la sonda amplificada es precisamente definida por el 5' terminal de los oligonucleótidos, permitiendo así una delimitación relativamente sencilla del tamaño óptimo de la sonda. (55,58)

Los tres métodos de marcaje del DNA permiten una gran flexibilidad para observar las extensiones de los fragmentos marcados. Cambiando la concentración de DNAsa con el *nick translation* se altera la extensión de los fragmentos, en la reacción de marcado por *Random Primer*, cambiando la concentración de los primers se altera la extensión de la región, y finalmente en la PCR, cambiando la secuencia de los oligonucleótidos se controla la extensión del fragmento. (58)

FLUOROCROMOS

Hay una gran variedad de fluorocromos que están disponibles para reacciones de hibridación *in situ*.

DIGOXIGENINA.

La digoxigenina es aislada de un esteroide de las plantas del genero *Digitalis* (*Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata*). Como las flores y las hojas de estas plantas son la única fuente natural de la digoxigenina, el anticuerpo es altamente específico y no se une a otro material biológico.

La DIG se une a la posición C-5 del nucleótido uridina vía una larga cadena que contiene once átomos de carbono. (61)

Los nucleótidos marcados con DIG se incorporan a la sonda de ácidos nucleicos por una DNA polimerasa (*E.coli* DNA polimerasa 1, T4 DNA polimerasa, T7 DNA polimerasa, transcriptasa reversa y *Taq* DNA polimerasa) así como RNA polimerasa (sp6, T3, T7 RNA polimerasa) y transferasa terminal. (57)

BIOTINA.

En principio la biotina se puede usar en el mismo sentido que la digoxigenina, ésta puede ser detectada por anticuerpos anti-biotina. Sin embargo, la estreptoavidina o la avidina son usadas más frecuentemente porque estas moléculas tienen una gran afinidad por la biotina. La avidina es una glicoproteína de 68 kd extraída de la clara de huevo y tiene una constante de unión de 10^{-15} M a 25° C.()

La marcación enzimática de ácidos nucleicos con biotina-dUTP fue desarrollada por David Ward y Coworkers, además se tienen otros nucleótidos biotinilados sintetizados como el adenosina biotinilado y trifosfato cisteína (62).

FLUORESCEINA.

Los nucleótidos marcados con fluoresceína pueden ser usados tanto para métodos directos, como métodos indirectos de hibridación *in situ*. La fluoresceína-dUTP/UTP/ddUTP y puede ser incorporada enzimáticamente dentro de los ácidos nucleicos. Es un marcador directo, el inconveniente de los métodos directos es que puede ser menos sensible que los métodos indirectos. Una alternativa, los nucleótidos marcados con fluoresceína pueden ser detectados con un anticuerpo anti-fluoresceína enzima conjugado o con un anticuerpo no conjugado y un anticuerpo secundario marcado con fluoresceína. (58)

Se tienen otros fluorocromos como el tetrametilrodamina-6-dUTP(rojo) y el amino-metilcumarina-6-dUTP. (azul) (58)

MÉTODOS NO RADIOACTIVOS DE HIBRIDACIÓN.

Directo e indirecto. En el método directo, la molécula detectable (reportera) es unida directamente a la sonda de ácidos nucleicos, así los híbridos pueden ser visualizados bajo un microscopio inmediatamente después de la reacción de hibridación. Para tal método es esencial que la sonda reportera resista las condiciones de hibridación y lavados, quizás lo más importante es que la molécula reportera no interfiera con la reacción de hibridación. (63)

Los procedimientos indirectos requieren de sondas que contengan una molécula reportera, introducida químicamente o enzimáticamente, que pueda ser detectada por afinidad citoquímica. Además, la presencia de la marca no debe interferir con la reacción de hibridación o la estabilidad del resultado híbrido. La molécula debe ser accesible a los anticuerpos. (57)

DISEÑO DEL ESTUDIO

Transversal descriptivo

Estructura: PROSPECTIVO y OBSERVACIONAL.

JUSTIFICACION.

En el Centro Nacional de Rehabilitación-Ortopedia la consulta de pacientes con neuropatías hereditarias es frecuente (entre 10 a 15 familias al año en el caso de *CMT*) y con fines de investigación resulta necesario implementar una técnica confiable para el diagnóstico.

La duplicación de *CMT-1A* no es visible por análisis citogenéticos habituales, y se requiere de técnicas moleculares costosas y consumidoras de tiempo. La hibridación *in situ* fluorescente es una técnica confiable con alta especificidad para la detección de la duplicación, por lo que hemos considerado este método el ideal para la detección.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En México no existe un método basado en la detección molecular específica de la duplicación que nos ayude hacer el diagnóstico adecuado y así poder brindar un asesoramiento genético más preciso.

HIPÓTESIS.

Realizando hibridación *in situ* fluorescente en pacientes con CMT-1A se encontrará la duplicación en tándem en la región 17p11.2-p12 que contiene al gen *PMP-22*.

OBJETIVOS.

- Realizar en el servicio de genética del CNR-Ortopedia la estandarización de la técnica de hibridación *in situ* fluorescente.
- Determinar la duplicación del gen *PMP-22* en pacientes con CMT-1A por la técnica de hibridación *in situ* fluorescente.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

1) CRISTALERIA.

- Cubre objetos de 22 x 22 mm.
- Frasco color ámbar de 1000 ml
- Matraces aforados de 250, 500 ml
- Matraces Erlenmeyer de 250, 500 ml
- Pipetas serológicas 1, 5, 10 ml
- Porta objetos de 26 x 76 mm.
- Vaso de coplín.
- Vaso de precipitado de 250, 500 ml

2) EQUIPO.

- Baño María a 45° C, 60° C, 70° C.
- Cámara húmeda.
- Horno o estufa a 55° C.
- Incubadora de CO₂ a 37° C.
- Termobloque a 75° C.
- Microscopio equipado para fluorescencia.

MATERIAL.

3) MATERIAL BIOLÓGICO.

- Muestras de sangre periférica con heparina.
- Sonda marcada con un fluorocromo con una longitud de onda de coloración roja.

4) REACTIVOS.

- Aceite de inmersión.
- Ácido acético glacial.
- Ácido clorhídrico.
- Alcohol etílico de 96°.
- Cemento de Rubber.
- Etanol frío, 70%, 90%, 100%.
- Formamida desionizada.
- Xilol.

5) SOLUCIONES.

- Solución Antifade 10 ml
- Solución de hibridación 2X.
- Amortiguador
- Solución de desnaturalización.
- Solución de lavado A.
- Solución de lavado B.
- Solución de lavado C.

METODOLOGÍA.

Se obtuvieron 12 muestras de sangre periférica de pacientes con un cuadro clínico de neuropatía periférica y con velocidades de conducción nerviosa motora y sensorial disminuidos de los nervios ulnar y peroneo, y 10 controles sanos del servicio de genética del Centro Nacional de Rehabilitación de la Ciudad de México.

Las muestras obtenidas fueron cultivadas de acuerdo a procedimientos de citogenética (pag. 40 cariotipo). Aunque el análisis fue realizado en núcleos en interfase, fueron expuestos los cultivos a colchicina de acuerdo a métodos para obtener cromosomas metafásicos en adición a los núcleos interfásicos. Se seleccionan las mejores preparaciones cromosómicas y en un coplín se guardaron en el horno 50 a 55°C. Las laminillas pueden ser dejadas por varios días.

Se llevó a cabo la técnica de hibridación *in situ* en las extensiones cromosómicas para microscopia de epifluorescencia, técnica que a continuación se describe:

- 1.) Las extensiones cromosómicas antes de realizar la hibridación; las secuencias blanco de DNA están rodeadas por proteínas que las enmascaran, por lo que con frecuencia requiere un proceso de permeabilización, con varios tratamientos.
 - 1.1) Con RNasa que sirve para remover el RNA endógeno permitiendo mejorar la señal de hibridación a razón DNA-DNA. Esto es hecho por

incubación de la preparación de RNasa (100 μ g) en 2X SSC a 37° C por 60 min.

- 1.2) Con HCL a una concentración de 200 mM por un período de 20 a 30 min. Es incluida para extracción de proteínas por hidrólisis y contribuye a mejorar la señal.
- 1.3) Con detergentes por lo general se utiliza Tritón X-100, duodecil sulfato de sodio, para eliminar las membranas del citoplasma.
- 2.) Se combinaron 20 a 30 ng de sonda marcada con la extensión cromosómica pretratada se introduce la laminilla a un coplín que contiene 50mL de solución de desnaturalización a 70°C en baño María por dos min.
- 3.) Se cubrieron con un cubreobjetos teniendo cuidado de que no queden burbujas y sellar el borde con cemento de rubber.
- 4.) Se dejaron hibridar durante toda la noche en cámara húmeda a 37° C.
- 5.) Al siguiente día se precalentaron coplín y los frascos de las soluciones de lavados A, B y C a 45°C, 60°C y 45°C respectivamente, usando las pinzas, cuidadosamente remueva el cemento de rubber sin quitar el cubre y pase la laminilla al coplín que contenía la solución de lavado A, agítela por 5 min. , Transfiera la laminilla a un coplín

con solución de lavado B, calentada a 60°C, se lava tres veces por 5 min. Con agitación, se pasa la laminilla a la solución de lavado C 3x5 min.

6.) Se escurrió la laminilla y adicionar 30 μ L de solución de antifade con yoduro de propidio o DAPI cubrir con un cubreobjetos, almacenar a 4°C en oscuridad y se revisó la laminilla con un microscopio de epifluorescencia.

TÉCNICA DE CARIOTIPO EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA.

1. - Las muestras de sangre se tomaron en condiciones estériles con jeringa heparinizada.
2. – Se colocaron 0.5 ml de sangre en 4.5 ml de medio de cultivo (RPMI 1640) suplementado con suero fetal bovino (0.5 ml) y antibióticos (penicilina 2000 U + estreptomycin 275 mg/ml). Las muestras se trabajaron por duplicado adicionando a los dos tubos el mitógeno. (fitohemaglutinina PHA)
3. – Se incubó a 37° C durante 70.5 hrs. Se adiciono 0.5 ml de solución de colchicina al 0,02 % (En agua destilada estéril) y se incubo a 37° C por 1.5 hr.
4. – Se centrifugaron los tubos a 3000 rpm durante 5 min.

5. — Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón. Se agregaron 5 ml de solución hipotónica (KCL 0.075 M) a 37° C agitando en el vortex. Se dejó reposar durante 30 min. a 37° C.
6. — Se centrifugó a 3000 rpm 5 min. Se decantó el sobrenadante y se agregó gota a gota y con agitación en el vortex 5 ml de fijador recién preparado. (metanol-ácido acético 3:1). Se dejó reposar 30 min. A temperatura ambiente.
7. — Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min y se decantó el sobrenadante, se resuspendió en 5 ml de fijador. Repetir esta operación cuantas veces sea necesario para obtener un botón blanco y un sobrenadante claro (5 veces aproximadamente).
8. - Para hacer las preparaciones se decantó el sobrenadante y se adicionaron 10 gotas de fijador para resuspender. Tomar con la pipeta Pasteur y dejar caer 2-3 gotas sobre cada laminilla perfectamente limpia y desengrasada desde una altura de 10-15 cm. Dejar secar al aire.
9. - Teñir con Giemsa durante 5 min. (3 ml de Giemsa + 47 ml de amortiguador de fosfatos pH 6.8. Lavar con agua corriente y dejar secar.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

a) COLCHICINA 0.02 %.

- Colchicina	0.02 g.
- Agua destilada estéril	100 ml

a) SOLUCIÓN HIPOTÓNICA DE KCL 0.0375 M.

- KCL	2.80 g.
- Agua destilada	1.0 lt.

b) FIJADOR DE CARNOY. (METANOL-ACIDO ACETICO, 3:1)

- Metanol	75 ml
-Ácido acético	25 ml

c) AMORTIGUADOR DE FOSFATOS pH 6.8

- Fosfato de Potasio Monobásico KH_2PO_4	6.63 g.
- Fosfato de Sodio Dibásico Na_2HPO_4	2.56 g.
- Agua destilada	1.0 lt.

d) SOLUCIÓN DE HIBRIDACIÓN 2X.

- Dextrán sulfato 20 g.
- SSC 4X 100 ml.

e) SOLUCIÓN DE DESNATURALIZACIÓN.

- Formamida desionizada 70 ml
- SSC 2X 30 ml.

Ajustar el pH 7.0 si es necesario con unas gotas de HCL o NaOH.

f) SOLUCIÓN DE LAVADO A.

- Formamida desionizada 50 ml
- SSC 2X 50 ml.

f) SOLUCIÓN DE LAVADO B.

- Formamida desionizada 50 ml
- SSC 0.1X 50 ml.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

g) SOLUCIÓN DE LAVADO C.

- SSC 4X 50 ml.
- Tween-20 50 ml.

h) SOLUCIÓN ANTIFADE (10 ml)

- DABCO (1,4 diazabicyclo[2,2,2] octano) 0.233 g.
- Tris HCL, pH 8.0 20 Mm.
- Glicerol 90%.
- Yoduro de propidio 200 ng/ml.

i) SOLUCIÓN ETANOL 70%

- Etanol absoluto 70 ml
- Agua destilada 30 ml

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

RESULTADOS.

ELABORACIÓN DE LA Sonda

Utilizando 250 ng de DNA genómico de sujetos normales se amplificaron los exones 1,2,3 y 4 del gen *PMP22* por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las condiciones de PCR fueron 0.2 mM de dNTP's de cada uno, buffer 1X para PCR, 3 mM de MgCl₂, 1μM de cada primer y 2U de *taq* DNA polimerasa en un volumen final de 50 μl.

PCR

	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización inicial.	94°C	2:30 min
	35 CICLOS	
Desnaturalización	94°C	1min
Alineación	60°C	1min
Extensión	72°C	1min
	FINAL	
Extensión	72°C	7min

Estas condiciones se realizaron para los exones 1,3, 4, en el exon 2 se modificó la temperatura de alineación a 55°C, con el mismo número de ciclos.

Posteriormente, se realizó un corrimiento de electroforesis en gel de agarosa al 1.35% (figura 3).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1.35% agarosa

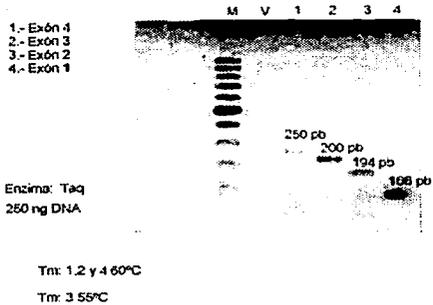


FIGURA 3.- Corrimiento de electroforesis donde se aprecian los 4 exones de PMP22 amplificados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MARCADO DE LA Sonda

Utilizando 300 ng de DNA genómico de sujetos normales se amplificó el exon 4 del gen *PMP22* por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

Las condiciones de PCR fueron; 200 μ M de dNTP's de cada uno (A,C,G), 100 μ M timidina, 60 μ M dUTP, amortiguador 1X para PCR, 3 mM de MgCl₂, 1 μ M de cada primer y 2U de taq DNA polimerasa en un volumen final de 50 μ l.

PCR

	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización inicial.	94°C	2:30 min
	35 CICLOS	
Desnaturalización	94°C	1min
Alineación	60°C	1min
Extensión	72°C	1min
	FINAL	
Extensión	72°C	7min

Posteriormente, se realizó un corrimiento de electroforesis en gel de agarosa al 1.35%.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AMPLIFICACIÓN INTRAGENICA DE PMP22.

1. -Utilizando 100 ng de DNA genómico de sujetos normales se amplificó la región que incluía los exónes 3 y 4 del gen PMP22 por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa
2. -Se utilizó una DNA polimerasa rTth la cual amplifica segmentos de 5 a 40 Kb con el programa XL del termociclador modelo 9700 (Perkin Elmer).
3. -Los oligonucleótidos fueron el F del exón 3 (5'TGCCAGCTCTCCTAAC3') y el R del exón 4 (5'CCTATGTACGCTCAGAG3') a una concentración de 0.2 μ M de cada uno, en un volumen final de 50 μ L.
4. -Condiciones de PCR.

	PRIMERA ETAPA	
	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización inicial.	94°C	1min
	16 CICLOS	
Desnaturalización.	94°C	15 seg
Alineación	63°C	10 min
	SEGUNDA ETAPA 12 CICLOS	
Desnaturalización	94°C	15 seg
Alineación	63°C	13 min
	FINAL	
Extensión	72°C	10 min

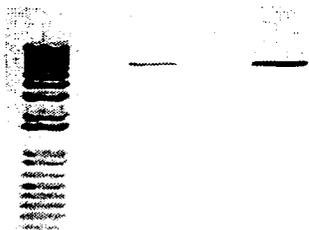
5. -Posteriormente, se realizó un corrimiento de electroforesis en gel de agarosa al 0.4%.

(fig. 4)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

0.4 % agarosa

- 1.- peso molecular
- 2.- exon 3-4
- 3.- exon 3-4



enzima DNA polimerasa rTth

T_m= 63 °C

FIGURA 4.- Corrimiento de electroforesis donde se aprecian la amplificación del exon 3 al 4 de PMP22. Dando un producto de PCR de 7 kb.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN.

En base al procedimiento de la PCR se amplificaron los cuatro exones del gen *PMP22*, uno de ellos se seleccionó por sus características de longitud, su pureza y por su Tm., para su marcado siendo el exón 4.

Para el marcado del exón seleccionado se realizó en un segundo tiempo PCR para incorporar las uridinas con el fluorocromo de una longitud de color rojo (Dato no mostrado). Se realizó un gel de agarosa y se intentó observarlo con el transiluminador, sin embargo las bandas eran muy tenues y no alcanzaron a ser captadas por la cámara.

Con esta sonda se analizaron 12 pacientes con diagnóstico de CMT1 y 10 controles. De los 22 casos estudiados solo dos pacientes resultaron positivos a las tres marcas fluorescentes, lo cual corrobora el diagnóstico de CMT1A. El resto de los pacientes así como los controles no presentaron las tres marcas esto puede ser debido a que los pacientes representen otro tipo de CMT, o que tengan mutaciones puntuales en *PMP22* y que por este método no hayan podido ser detectados. En el caso de los controles se confirma la presencia del gen *PMP22*.

Se elaboró una sonda más grande en longitud, con la finalidad de amplificar el tamaño de la marca y que fuera más específica. Se realizó un PCR que amplificó del exón 3 al exón 4, utilizando una enzima que amplifica segmentos de 5 a 40 Kb, la DNA polimerasa rTth (PE), obteniendo un producto de PCR de 7kb, el cual fue marcado por "Nick translation".

Sin embargo se analizaron los mismos 12 pacientes y los 10 controles de los cuales ninguno hibridó. Esto pudo ser debido a varios factores; 1) el procedimiento de nick translation, 2) las condiciones de hibridación, y 3) por el tamaño de la sonda que provocaría conformaciones secundarias que impidieron un buen alineamiento.

CONCLUSIONES

La duplicación en CMT1A es un buen marcador biológico de la enfermedad, esta mutación es mitótica y meioticamente estable que se cosegrega con la enfermedad en familias y correlaciona con el estándar de oro para el diagnóstico, como es la electroforesis en campos pulsados.

La detección de la duplicación del 17p es particularmente útil en el diagnóstico, esto se aplica especialmente para pacientes sin historia familiar, cuando la presencia de la duplicación nos ayuda a distinguir de otras neuropatías demielinizantes, particularmente de polineuropatías demielinizante inflamatoria crónica, y en familias que se conoce la duplicación es posible el análisis de DNA en presintomáticos y estudio prenatal.

Esta técnica es menos invasiva que estudios de conducción nerviosa (aunque más consumidora de tiempo). La razón más importante para hacer la identificación en niños afectados quienes necesariamente tienen que ser valorados regularmente para detectar tempranamente deformidades esqueléticas que pueden ser prevenidos con apropiadas medidas ortésicas y ortopédicas. Además es de gran valor para el pronóstico y eventual tratamiento.

En el presente trabajo el análisis mediante FISH permitió la identificación de la duplicación de *PMP22*, la cual se encontró solamente en 16% 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* difiere a lo reportado en la literatura, ya que la forma CMT1A con esta 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, además de realizar secuenciación en los exones de *PMP22* y descartar mutaciones puntuales.

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. 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. A pesar 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.

Finalmente, la normalización de la expresión del producto del gen *PMP22* por métodos de terapia génica, incluyendo tecnología de ácido nucleico antisentido, podría ser un procedimiento que se utilice en el futuro para tratar la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA.

1. - Harding A.E. From the syndrome of Charcot, Marie and Tooth to disorders of peripheral myelin proteins. *Brain* (1995), 118, 809-818.
2. - Suter U., Snipes G.J. Biology and Genetics of Hereditary Motor and Sensory Neuropathies. *Annu. Rev. Neurosci.* (1995), 18:45-75.
3. - Bell C., Haites A. Genetic aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. *Archives of Disease in Childhood.* 1998, 78:4, pag 296-300.
4. - Lupski J.R. Charcot-Marie-Tooth Disease: A Gene-Dosage Effect. *Molecular Genetics in Clinical Practice* (1997), May 15.
5. - Shy M.E., Kamholz J., and Lovelace R.E. Charcot-Marie-Tooth Disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1999), Sept. 14; 883:1-6.
6. - Lupski J.R., Chance P.F., Garcia C.A. Inherited Primary Peripheral Neuropathies: Molecular genetics and clinical implications of CMT1A and HNPP. *JAMA* (1993), Nov 17, No. 19, 270:2326-2330.
7. - Thomas P.K., Overview of Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1999), Sept. 14; 883:1-6.

8. - Griffin J.W., Sheikh Kazim. Schwann Cell-Axon Interactions in Charcot-Marie-Tooth Disease. . Annals of the New York Academy of Sciences (1999), Sept. 14; 883:77-89.
9. - Kamholz J. Awatramani R., Menichella D., Jiang H., Xu W., and Shy Michael. Regulation of Myelin-Specific Gene Expression. Annals of the New York Academy of Sciences (1999), Sept. 14; 883:91-107.
10. - Jessen K.R., Mirsky R. Why Do Schwann Cell Survive in the Absence of Axons? . Annals of the New York Academy of Sciences (1999), Sept. 14; 883:109-115.
11. - Haney C., Jackson S.G., Shooter E.M., Suter U., Garcia C., Griffin J.W., Trapp B.D. Ultrastructural Distribution of PMP22 in Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A. J. Neuropathology and Exp. Neurol. (1996), March, vol. 55, No 3: 290-299.
12. - Vallat J.M., Sindou P., Preux P.M., Tabaraud F., Milor A.M., Couratier P., LeGuern E., and Brice A. Ultrastructural PMP22 Expression in Inherited Demyelinating Neuropathies. Ann. Neurol (1996), 39:813-817.
13. - Sahenk Z. Abnormal Schwann Cell-Axon interactions in CMT Neuropathies. Annals of the New York Academy of Sciences (1999), Sept. 14; 883:415-426.
14. - Scherer S. Nodes, Paranodes, and Incisures: From Form to Function. Annals of the New York Academy of Sciences (1999), Sept. 14; 883: 131-143.

15. – Kamholz J., Menichella D., Jani A., Garbern J., Lewis R.A., Krajewski K.M., Lilien J., Scherer S.S., and Shy M.E., Charcot-Marie-Tooth disease type 1 Molecular pathogenesis to gene therapy. *Brain* (2000), 123, 222-233.
- 16 – Warner L.E., Reiter L.T., Murakami T., and Lupski J.R. Molecular Mechanisms for Charcot-Marie-Tooth Disease and Related Demyelinating Peripheral Neuropathies. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, volume LXI (1996); 673-677.
17. – Ritz M.F., Lechner-Scott J., Scott R.J., Fuhr P., Malik N., Erne B., Taylor V., Suter U., Schaeren-Wiemers N., Steck A.J. Characterisation of autoantibodies to peripheral myelin protein 22 in patients with hereditary and acquired neuropathies. *J. Neuroimmunology* (2000), 104:155-163.
18. – Gambardella A., Bono F., Muglia M., Valentino P., and Quattrone A. Autosomal Recessive Hereditary Motor and Sensory Neuropathies with Focally Folded Myelin Sheaths (CMT4B). *Annals of the New York Academy of Sciences* (1999), 14; 883. pag. 47-55.
19. – Guilbot A., Kessali M., Ravisé N., Hammadouche T., Bouhouche A., Maisonobe T., Grid D., Brice A., and Leguern E. The Autosomal Recessive Form of CMT Disease Linked to 5q31-q33. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1999), 14; 883. pag. 56-59.
20. – Timmerman V., Beuten J., Irobi J., De Jonghe P., Martin J.J., and Van Broeckhoven C. Distal Hereditary Motor Neuropathy Type II (Distal HMN type II): Phenotype and Molecular Genetics. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1999), Sept. 14; 883:60-64.

21. – Vance J.M. Charcot-Marie-Tooth Type 2. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1999), 14; 883. pag. 42-45.
22. – Fischbeck K.H., Deschenes S.M., Bone L.J. and Scherer S.S. Connexin32 and X-linked Charcot-Marie-Tooth Disease. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. (1996), vol. LXI.
23. – Bone L.J., Deschenes S.M., Balice-Gordon R.T., Fischbeck K.H., and Scherer S.S. Connexin32 and X-linked Charcot-Marie-Tooth Disease. *Neurobiology of Disease*. (1997), 4:221-230.
24. – Fischbeck K.H., Abel A., Lin G.S., and Scherer S.S. X-linked Charcot-Marie-Tooth Disease and Connexin32. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1999), Sept. 14; 883:36-41.
25. – Gabreëls-Festen A.A.W.M., Bolhuis P.A., Hoogendijk J.E., Valentijn L.J., Eshuis E.J.H.M., Gabreëls F.J.M. Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A: morphological phenotype of the 17p duplication versus PMP22 point mutations. *Acta Neuropathol.* (1995), 90:645-649.
26. – Navon R., Seifried B., Shoham N., A new point mutation affecting the fourth transmembrane domain of PMP22 results in severe, de novo Charcot-Marie-Tooth Disease. *Hum Genet* (1996), 97:685-687.

27. – Tyson J., Malcolm S., Thomas P.K., Harding A.E. Deletions of Chromosome 17p11.2 in Multifocal Neuropathies. *Ann Neurol* (1996), 39:180-186.
28. – Harati Y. Congenital hypomyelinating neuropathy. *J.Neurol. Neurosurg. Psychiatry* (1985) 48:1269.
29. – Chance P.F., Rosenberg S.B., Prusiner S., DiMauro R.L., Barchi & Kunkel L.M. Overview of Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1999), 14; 883.
30. – Garcia C.A.. A Clinical Review of Charcot-Marie-Tooth. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1999), 14; 883. pag. 69-75.
31. – Hanemann C.O., Muller H.W. Pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth 1A (CMT1A) neuropathy. *Trends Neurosci.* (1998), 21:282-286.
32. – Roa B.B., Garcia C.A., Suter U., Kulpa D.A., Wise C.A., Mueller J., Welcher A.A., Snipes G.J., Shooter E.M., Patel P.I., and Lupski J.R. Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A. Association with a Spontaneous Point Mutation in the PMP22 Gene. *The New England J. Of Medicine.* (1993), July 8: 96-101.
33. – Lupski J.R. Genomic Disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *TIG.* (1998), Oct, No.10, vol. 14.

34. – Han L.L., Keller M.P., Navidi W., Chance P.F., and Arnheim N. Unequal exchange at the Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A recombination hotspot not elevated above the genome average rate. *Human Molecular Genetics*, (2000), vol. 9, No 12, 1881-1889.
35. – Hertz J.M., Borglum A.D., Brandt C.A., Flint T., Bisgaard C. Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A. the parental origin of a de novo 17p11.2-p12 duplication. *Clinical Genetics* (1994), 46:291-294.
36. – Roa B.B., Greenberg F., Gunaratne P., Sauer C.M., Lubinsky M.S., Kozma C., Meck J.M., Magenis R.E., Shaffer L.G., Lupski J.R., Duplication of the PMP22 gene in 17p partial trisomy patients with Charcot-Marie-Tooth Disease Type-1A neuropathy. *Hum Genet.* (1996), 97:642-649.
37. – Patel P.I., Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A: mutational mechanisms and candidate gene. *Current Opinion in Genetics and Development* (1993), 3: 438-444.
38. – Pentao L., Wise C.A., Chinault A.C., Patel P.I., Lupski J.R. Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication appears to arise from recombination repeat sequences flanking the 1.5 MB monomer unit. *Nat. Genet* (1992), 2:292.
39. –Boerkoel C.F., Inoue K., Reiter L. T., Warner L.E., and Lupski J.R., Molecular Mechanisms for CMT1A duplication and HNPP deletion. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1999), 14; 883. pag. 22-31

40. – Nelis E. Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Eur J Hum Genet* (1996), 4:25.
41. – Bird T.D. Historical Perspective of defining Charcot-Marie-Tooth Type 1B. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1999), 14; 883. pag. 6-11.
42. – Chance P.F. Two autosomal dominant neuropathies result from reciprocal DNA duplication/deletion of a region on chromosome 17. *Hum. Mol. Genet.* (1994), 3:223-228.
43. – Lopes J., Tardieu S., Silander K., Blair Ian., Vandenberghe A., Palau F., Ruberg M., Brice A., and 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. *Human Molecular Genetic*, 1999, Vol. 8, No. 12, pag. 2285-2292.
44. – Reiter L.T., Murakami T., Koeuth T., Pentao L., Muzny D.M., Gibbs R.A., & Lupski J.R., A recombination hotspot responsible for two inherited peripheral neuropathies is located near a mariner transposon-like element. *Nat. Genet* (1996), 12:288.
45. – Kiyosawa H., Chance P.F. Primate origin of the CMT1A-REP repeat and analysis of a putative transposon-associated recombinational hotspot. *Human Molecular Genetics* (1996), Vol. 5. 6:745-753.
46. – Fedoroff N.V. Elementos Genéticos Transponibles Del Maíz. *Investigación y Ciencia*, Abril de 1980. pag.45-55.

47. — Oosumi T., Belknap W.R., Garlick B., Mariner Transposons in Humans. *Nature* Vol.378
14 de diciembre de 1995.
48. — Reiter L.T., Liehr T., Rautenstrauss B., Robertson H.M., Lupski J.R. Localization of
mariner DNA Transposons in the Human Genome by PRINS. *Genoma Research*. June
29,1999.
49. — Cohen S.N., Shapiro J.A. Transposable Genetic Elements. *Investigación y Ciencia*, Abril
de 1980. Pág.311-320.
50. — Kazazian H.H., Moran J.V. The impact of L1 retrotransposons on the Human genome.
Nature Genetics Vol. 19, may 1998, Pág 19-24.
51. — Vandenberghe A., Latour P., Chauplannaz G., Chapon F., Pouget J., Dumas R.,
Laguenay A., Ollagnon E., Bost M., Duthel S., Chazot G., and Boucherat M. Molecular
diagnosis of Charcot-Marie-Tooth 1A disease and hereditary neuropathy with liability to
pressure palsies by quantifying CMT1A-REP sequences: consequences of recombinations at
variant site on chromosome 17p11.2-12.clin. chem.42: 7, 1021-1025. (1996).
52. — Chang JG., Jong YJ., Wang WP., Wang JC., Hu CJ., Lo MC., Chang CP. Rapid
detection of a recombinant hotspot associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A
duplication by a PCR-based DNA test. *Clinical Chemistry* 44:2, 1998, pag 270-274.

53. – Latour P., Boutrand L., Levy N., Bernard R., Boyer A., Claustrat F., Chazot G., Boucherat M., and Vandenberghe A. Polymorphic Short Tandem Repeats for Diagnosis of the Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication. *Clinical Chemistry* (2001),47:5, 829-837.
54. – Badano J.L., Inoue K., Katsanis N., and Lupski J.R. New Polymorphic Short Tandem Repeats for PCR-based Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication Diagnosis. *Clinical Chemistry* (2001),47:5, 838-843.
- 55.- Blair I.P., Kennerson M.L., Nicolson G.A. Detection of Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication by the polymerase chain reaction, *clin. chem.*41: 8,1105-1108 (1995).
- 56.- Nelis E., Timmerman V., DeJonghe P., Vandenberghe A., Pham-Dinh D., Dautigny A., Martin J.J., Van Broeckhoven C. Rapid screening of myelin genes in CMT1 patients by SSCP analysis: identification of new mutations and polymorphisms in the Po gene. *Hum Genet.* (1994), 94:653-657.
57. – Shaffer L. G. Kennedy G.M., Spikes A.S., Lupski J.R. Diagnosis of CMT1A Duplications and HNPP Deletions by Interphase FISH: Implications for Testing in the Cytogenetics Laboratory. *Ame. J. Medical Genetics* (1997), 69:325-331.
58. – Lupski J.R. DNA Diagnostics for Charcot-Marie-Tooth Disease and Related Inherited Neuropathies. *Clinical Chemistry.* (1996), No 7, 42:995-998.

59.- M. de L. Segura Valdez. Hibridación in situ Ultraestructural. 1er. edición 1997, Plaza y Valdes editores.

60. – Taneja K.L., Chavez E.A., Coull J., and Lansdorp P.M. Multicolor Fluorescence In Situ Hybridization With Peptide Nucleic Acid Probe for Enumeration of Specific Chromosomes in Human Cell. *Genes, Chromosomes & Cancer* (2001), 30:57-63.

61.- Swiger R.R., Tucker J.D. Fluorescence In situ Hybridization: A Brief Review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1996;27, Pag. 245-254.

62.- Nath J., Johnson K.L. Fluorescence In situ Hybridization (FISH): DNA Probe Production and Hybridization Criteria. *Biotechnic & Histochemistry*. Aug. 6, 1997, pag 6-22.

63.- Van Ommen G.J.B., Breuning M.H., and Raap A.K., FISHn genome research and molecular diagnostics. *Current Opinion in Genetics and Development* 1995, 5:304-308.