

Estudio molecular de una familia con duplicación del gen PMP22 y gran variabilidad fenotípica

María de la Luz Arenas-Sordo,* Edgar Hernández-Zamora,* Rocío Gómez-Ortega,*
Margarita Valdés-Flores,* Socorro Lona-Pimentel,** Margoth Castillo-Herrera**

Resumen

Introducción. La neuropatía hereditaria más frecuente del sistema nervioso periférico humano es la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), caracterizada por atrofia muscular peronea y pie cavo. El subtipo 1A (CMT1A) es responsable de aproximadamente 60 % de todos los casos de CMT, y está asociado en 70 % de los casos a duplicación de ~1.5 Mb de ADN en 17p11.2-p12 (PMP22). Nuestro objetivo fue estudiar una familia en la que se detectó la duplicación del gen mediante electroforesis capilar, y describir las características clínicas y electrofisiológicas para identificar cómo varía la severidad de la enfermedad entre familiares.

Material y métodos: Fueron analizados cinco sujetos pertenecientes a una misma familia, con diagnóstico clínico y electrofisiológico de CMT, en los que se encontró gran variabilidad fenotípica. Se amplificaron tres STR descritos como 4A, 9A y 9B para identificar la duplicación y realizar el diagnóstico de CMT1A.

Resultados: Mediante electroforesis capilar encontramos que todos presentaron la duplicación del gen, sin embargo, la expresión fenotípica fue muy diferente entre los individuos, un varón con gran afección y cuatro mujeres prácticamente asintomáticas.

Conclusiones: Los resultados nos permitieron detectar con certeza la presencia de la enfermedad en las cuatro mujeres que no se consideraban portadoras de la patología y ofrecer asesoramiento genético adecuado.

Palabras clave: Electroforesis capilar, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, neuropatía hereditaria.

Summary

Background: Peripheral nerve and its more frequent subtype CMT1A has been associated with duplication in tandem of a fragment of DNA of 1.5 Mb in 17p11-p12. This region contains the coding sequence of the peripheral myelin protein 22 (PMP22).

The aim of this study is to highlight the importance of identifying the duplication of gene PMP22 in the family members of patients, even though they do not have important clinical features, in order to offer them adequate genetic counseling.

Methods: For identification of the duplication of gene PMP22 we searched for the STR polymorphisms 4A, 9A and 9B as described by Latour by capillary electrophoresis in a patient with clinical and electrophysiological diagnosis of CMT and his four asymptomatic sisters.

Results: We found all sibs have the PMP22 duplication, but only the patient demonstrates the entire spectrum of the disease. His sisters have only minor anomalies, except for one sister who does not have any anomalies, but electrophysiological studies were positive for all sibs.

Conclusions: By studying this family we can emphasize the importance of molecular studies for providing certainty of the diagnosis in order to offer patients and their relatives adequate genetic counseling.

Key words: Capillary electrophoresis, Charcot-Marie-Tooth disease, hereditary neuropathy.

Introducción

La neuropatía periférica de Charcot-Marie-Tooth (CMT) es la enfermedad hereditaria más común del sistema nervioso periférico humano. El subtipo más frecuente es CMT1A, responsable de aproximadamente 60 % de todos los casos de CMT,^{1,2} y está asociado en 70 % de los casos a duplicación en tandem de ~1.5 Mb en 17p11.2-p12, donde se encuentra el gen que codifica para la proteína PMP22, constituido por cuatro exones y dos promotores. CMT1A presenta una transmisión autosómica dominante. El diagnóstico clínico de la enfermedad se basa en el estudio familiar, las deformaciones físicas, el estudio electrofisiológico y las anomalías patológicas. Un diagnóstico temprano permite prevenir o corregir las alteraciones, así como brindar un adecuado asesoramiento genético.³⁻⁶

* Servicio de Genética.

** Servicio de Electrodiagnóstico.

Instituto Nacional de Rehabilitación, México, D. F.

Solicitud de sobretiros:

María de la Luz Arenas-Sordo y Edgar Hernández-Zamora,
Instituto Nacional de Rehabilitación,
Servicio de Genética,
Av. México-Xochimilco 289, Col. Arenal de Guadalupe, Del. Tlalpan, 14389
México, D. F.
Tel.: (55) 5999 1000, extensiones 19405 y 19402.
Fax: (55) 5645 5603.
E-mail: asgk@servidor.unam.mx; edghernandez@inr.gob.mx;
edgarhz1969@yahoo.com.mx

Recibido para publicación: 04-03-2008

Aceptado para publicación: 02-06-2008

En la literatura existen pocos estudios en los cuales se describa que la severidad de la enfermedad varía entre individuos aún dentro de la misma familia, de ser casi asintomáticos hasta presentar importante deformidad del pie en cavo y pérdida sensorial.^{7,8} En este trabajo estudiamos a una familia en la que se identificó la duplicación del gen PMP22 mediante electroforesis capilar, se describieron diferentes características clínicas y electrofisiológicas que demostraron gran variabilidad fenotípica.

La electroforesis capilar es solo un tipo de análisis entre la gran cantidad que existe para la búsqueda de anomalías en el ADN, el ARN o las proteínas, y que en conjunto se conocen como estudios moleculares.

Material y métodos

Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo, en el cual se incluyó a todos los hermanos de una familia debido a que uno de ellos, el varón, presentó diagnóstico clínico y electrofisiológico de CMT.

El propósito o caso índice (III-8) fue un hombre de 27 años de edad que acudió al Instituto Nacional de Rehabilitación por presentar debilidad generalizada, siendo más grave en forma distal tanto de miembros superiores como inferiores. Entre los antecedentes heredofamiliares mencionó que el padre (II-6) y una prima paterna (III-2) presentaban el mismo padecimiento (figura 1). Negó consanguinidad y endogamia. A los 17 años de edad se hizo notorio el padecimiento debido a debilidad muscular y con ello la incapacidad para realizar ciertos ejercicios; desde entonces había progresado.

Estudios electrofisiológicos

Fueron efectuados utilizando un equipo Nicolet Biomedical Viking IV. El estudio de velocidad de neuroconducción motora fue realizado con electrodos de superficie. La neuroconducción sensorial fue investigada en los nervios ulnar, medial, sural y nervio peroneo superior de todos los individuos mediante técnicas estándar.^{9,10}

Estudio clínico

Se realizó historia clínica que incluyó antecedentes heredofamiliares, padecimiento actual, exploración física completa, examen manual muscular,³⁻⁶ búsqueda de reflejos osteotendinosos y árbol genealógico.

PCR

Se utilizaron iniciadores para amplificar los STR descritos como 4A (116 bp), 9A (162 bp) y 9B (235 bp) por Latour en 2001 para el diagnóstico de CMT1A. Los iniciadores *forward* fueron modificados en el extremo con 5' HEX™ (4A y 9A) y TET™ (9B), y amplificados bajo las siguientes condiciones: 50 ng de ADN genómico, AmpliTaq Gold™ Perkin Elmer de 5 U/μl, MgCl₂ mM, Regulador 1X, dNTP's 0.4 mM, volumen final 20 μl. El esquema utilizado fue 5 minutos a 94 °C, 35 ciclos; 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C, 2 minutos a 68 °C, y una extensión final de 5 minutos a 68 °C. Todas las amplificaciones se realizaron con un blanco sin ADN.¹¹

Electroforesis capilar

Para la electroforesis capilar se utilizó un equipo ABI PRISM 310 Genetic Analyzer PE (Applied Biosystems, Foster City, Ca.). Preparación de las muestras: 2 μl de producto de PCR de cada muestra, 5 μl de marcador de peso molecular TAMRA 500 (Applied Biosystems); fueron desnaturalizadas a 98 °C por siete minutos. Las condiciones en la electroforesis capilar fueron tiempo de inyección, 5 segundos; voltaje, 15 kV; temperatura, 60 °C; tiempo, 26 minutos. En cada determinación se incluyó una muestra de TAMRA 500 sin producto de PCR como blanco, una muestra de un control negativo y una prueba de color para comprobar el adecuado funcionamiento del equipo. La información fue analizada con el *software* GeneScan (Applied Biosystems) y guardada como un archivo de muestras para cada reacción en el que se colectaron y analizaron los datos, que se presentaron como electroferogramas de cada una de las muestras. Se creó un patrón de peso molecular individual para cada archivo, que corresponde al marcador de peso molecular TA-

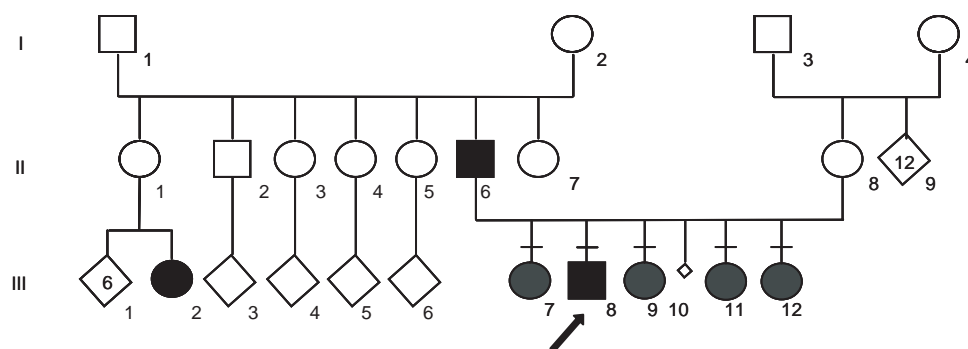


Figura 1. Árbol genealógico.

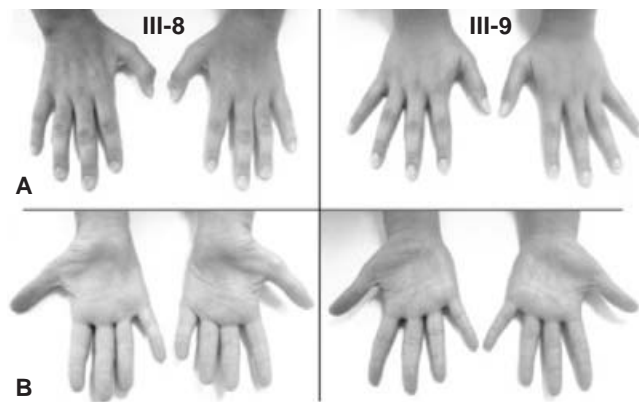


Figura 2. Características clínicas.

MRA 500 según el protocolo de uso recomendado por Applied Biosystems.¹²⁻¹⁷

Análisis de los datos

El programa GeneScan proporciona los valores en unidades de fluorescencia relativa (UFR) de las áreas de los picos que corresponden a la señal fluorescente del marcador; los resultados mejoran si se obtienen señales entre 150 y 6000 RTU. Todos nuestros experimentos mostraron resultados dentro de este rango. Todas las pruebas se realizaron por triplicado y fueron descargadas a una base de datos, se obtuvo promedio y desviación estándar y se aplicó *t* de Student. Se determinaron las áreas relativas correspondientes a los segmentos 4A, 9A y 9B de cada individuo, comparadas con un control negativo, encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$).

Resultados

En la exploración física del paciente índice III-8 se observó talla de 1.83 m y peso de 80 kg, marcha anormal en *steppage*; hipotrofia muscular de cintura escapular; adelgazamiento en un ter-

cio distal de los muslos y en toda la pierna (bilateral); hipotrofia de eminencias tenar e hipotenar y de músculos interóseos; pies ligeramente en cavo; reflejos osteotendinosos ausentes en miembros inferiores y sensibilidad disminuida. En la figura 2 se observan algunas características físicas de los sujetos III-8 y III-9.

Debido a las características del paciente y a que el padre también estaba afectado, se decidió estudiar a los demás integrantes de la familia. En el cuadro I se muestran las características clínicas y electrofisiológicas encontradas en el paciente (III-8) y sus cuatro hermanas, identificadas como III-7, III-9, III-11 y III-12. Todos presentaron velocidad de neuroconducción motora menor a 37 m/s, principalmente en los nervios peroneos (derecho e izquierdo). En el estudio molecular mediante electroforesis capilar encontramos que todos tuvieron duplicación con alguno de los marcadores en comparación con el control negativo, como se observa en los electroferogramas de la figura 3, donde se incluyen los correspondientes a los marcadores 4A, 9A y 9B del individuo III-9 y el control negativo. Con los valores de las áreas relativas en UFR se graficó la relación de proporciones en los individuos con duplicación de PMP22 y el control negativo (figura 4).

La persona II-1 del árbol genealógico es hermana del padre de nuestro paciente y por referencia es aparentemente normal, sin embargo, no pudo ser revisada. Su hija, también por referencia, muestra características similares, pero en menor grado que nuestro paciente.

Discusión

Las características clínicas del fenotipo originalmente descrito por Charcot, Marie y Tooth incluyen debilidad distal y atrofia temprana en músculos peroneos,^{18,19} con eventual extensión a los dedos de las manos, hiporreflexia, pies cavos y alteraciones sensitivas distales, particularidades que presentó el paciente III-8. Sin embargo, en los otros individuos no eran evidentes, por lo que es notoria la gran variabilidad en la expresión fenotípica (cuadro I). La mujer III-11 no presentó anomalías en ninguna extremi-

Cuadro I. Datos clínicos de CMT1A en los integrantes de una familia

Clave	Sexo	Edad (años)	Talla (m)	Peso (kg)	AHF	VNCM	Pie		S	ROT	Examen manual muscular			Examen molecular (duplicación)		
							cavo	HDMI			Peroneo	Tibial ant.	Otros	4A	9A	9B
III-7	F	29	1.60	78	Sí	↓	+	—	n	n	5	5	4-5	+	+	+
III-8	M	27	1.83	80	Sí	↓	+	+	↓	↓	3	2	3-4	+	—	—
III-9	F	25	1.67	68	Sí	↓	+	—	n	n	4	4-5	4-5	+	+	+
III-11	F	24	1.66	80	Sí	↓	—	—	n	n	4-5	5	4-5	+	—	+
III-12	F	19	1.66	73	Sí	↓	+	—	n	n	4	4	4-5	+	+	—
C—	F	40	1.63	70	No	n	—	—	n	n	5	5	5	—	—	—

AHF = antecedentes hereditarios, VNCM = velocidad de neuroconducción motora, ↓ = disminuido, + = presencia, — = ausencia, n = normal, HDMI = hipotrofia distal de miembros inferiores, S = sensibilidad, ROT = reflejos osteotendinosos, C— = control negativo.

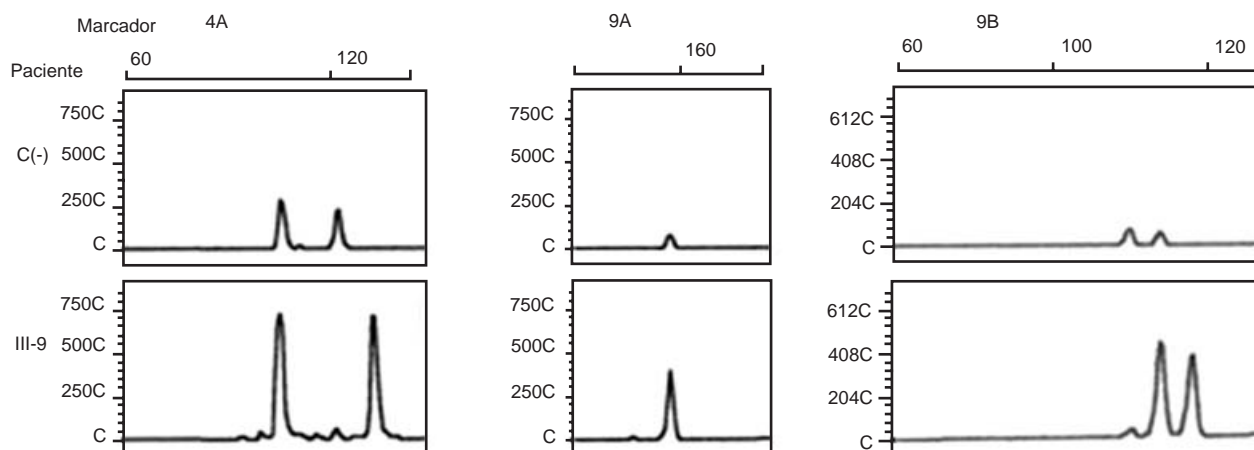


Figura 3. Electroferogramas del sujeto III-9 y el control negativo (C-) con los marcadores 4A, 9A y 9B.

dad, solo ligera disminución en la velocidad de neuroconducción motora; sin embargo, en el estudio molecular se detectó la duplicación del gen PMP22. Las mujeres III-7, III-9 y III-12 tuvieron ligeras anomalías en los pies, solo evidentes hasta que se les realizó exploración física; la marcha fue normal y hubo ligera disminución de la fuerza muscular, no así de la sensibilidad ni de los reflejos.

El estudio molecular debe ampliarse a toda la familia, ya que al parecer hay más integrantes afectados y otros que si bien en apariencia no lo están deben ser portadores de la enfermedad, como la persona II-1 cuya hija debió heredar el gen de ella.

El presente trabajo nos permite establecer que los estudios moleculares son necesarios incluso en ausencia de manifestaciones, para identificar si las personas son o no portadoras del gen mutante y pueden transmitirlo con un riesgo de 50 %, y así ofrecer un adecuado asesoramiento genético, explicar cómo es la evolución y los posibles tratamientos quirúrgicos, rehabilitatorios o con medicamentos. Es fundamental hacer hincapié en que las manifestaciones menores en una persona no necesariamente se presentarán así en su descendencia, la cual puede estar afectada con mayor o menor gravedad que el progenitor.²⁰

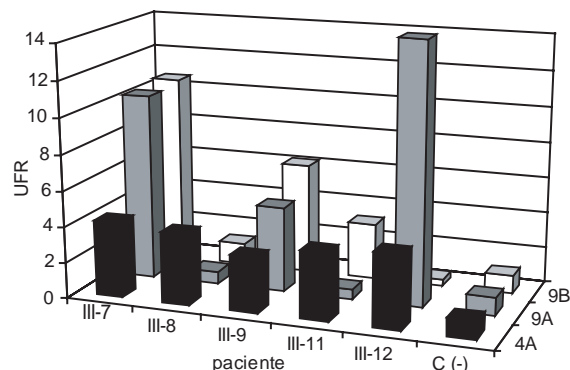


Figura 4. Proporciones de áreas relativas con los marcadores 4A, 9A y 9B de los familiares con diagnóstico de CMT1A.

Referencias

1. Saifi GM, Szigeti K, Snipes GJ, García CA, Lupski JR. Molecular mechanisms, diagnosis, and rational approaches to management of and therapy for Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies. *J Invest Med* 2003;51:261-283.
2. Benstead TJ, Grant IA. Progress in clinical neurosciences: Charcot-Marie-Tooth disease and related inherited peripheral neuropathies. *Can J Neurol Sci* 2001;28:199-214.
3. Rodríguez-García PL, Rodríguez-Pupo L, Rodríguez-García D. Técnicas clínicas para el examen físico neurológico. I. Organización general, nervios craneales y nervios raquídeos periféricos. *Rev Neurol* 2004;39:757-766.
4. Rodríguez-García PL, Rodríguez-Pupo L, Rodríguez-García D. Técnicas clínicas para el examen físico neurológico. II. Funciones motora y refleja. *Rev Neurol* 2004;39:848-859.
5. Rodríguez-García PL, Rodríguez-Pupo L, Rodríguez-García D. Técnicas clínicas para el examen físico neurológico. III. Funciones sensoriales. *Rev Neurol* 2004;39:966-971.
6. Amo-Usanos C, Amo-Merino P, Amo-Usanos I, Franco-Carcedo C, González-Hidalgo M, Puente-Muñoz AI, et al. Sobre el diagnóstico de las neuropatías periféricas: estudio clínico y neurofisiológico. *Rev Neurol* 2001;32:123-126.
7. Kumar N, Cole J, Parry GJ. Variability of presentation in hereditary neuropathy with liability to pressure palsy results in underrecognition. *Ann NY Acad Sci* 1999;883:344-350.
8. 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;48:489-493.
9. Dumitru D. Fundamental principles. In: Zwats MJ, Amato AA, eds. *Electrodiagnostic Medicine*. Philadelphia: Hanlel & Belfus;2001. pp. 145-161.
10. DeLisa JA, Lee HJ, Baran EM, Lai KS, Spielholz N, Mackenzie K. Introduction. In: DeLisa JA, Baran EM, Mackenzie K, eds. *Manual of Nerve Conduction Velocity and Clinical Neurophysiology*. 3rd ed. New York: Raven Press;1994. pp. 12-20.
11. Latour P, Boutrand L, Levy N, Bernard R, Boyer A, Claustrat F, et al. Polymorphic short tandem repeats for diagnosis of the Charcot-Marie-Tooth 1A duplication. *Clin Chem* 2001;47:829-837.
12. Castagnino JM. Electroforesis capilar. *Bioquímica* 2000;25:13-32.
13. Pereira-Vianello BR, Grattapaglia D. Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. *Biotechniques* 2001;31:793-800.

14. Bhattacharya A, Bhattacharya S, Joshi A, Ramachandran S, Ramaswamy R. Identification of parasitic genes by computational methods. *Parasitol Today* 2000;16:127-131.
15. Mansfield ES, Blasband A, Kronick MN, Wrabetz L, Kaplan P, Rappaport E, et al. Fluorescent approaches to diagnosis of Lesch-Nyhan syndrome and quantitative analysis of carrier status. *Mol Cell Probes* 1993;7:311-324.
16. Mansfield ES, Robertson JM, Lebo RV, Lucero MY, Mayrand PE, Rappaport E, et al. Duchenne/Becker muscular dystrophy carrier detection using quantitative PCR and fluorescence-based strategies. *Am J Med Genet* 1993;48:200-208.
17. Mansfield ES, Vainer M, Harris DW, Gasparini P, Estivill X, Surrey S, et al. Rapid sizing of polymorphic microsatellite markers by capillary array electrophoresis. *J Chromatogr A* 1997;781:295-305.
18. Stógbauer F. Genética de las neuropatías hereditarias. *Rev Neurol* 2001;32:156-164.
19. Gemignani F, Melli G, Alfieri S, Inglese C, Marbini A. Sensory manifestations in Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst* 2004;9:7-14.
20. Hernández-Zamora E, Arenas-Sordo ML, Escobar-Cedillo RE, González-Huerta NC, Leyva-García N, Maldonado-Rodríguez R. Strategies for clinical and molecular diagnosis of Charcot-Marie-Tooth 1A among Mexican patients. *Gac Med Mex* 2007;143:383-389.