

Estrategias para el diagnóstico clínico y molecular de Charcot-Marie-Tooth 1A. Estudio en pacientes mexicanos

Edgar Hernández-Zamora,^{a,*} María de la Luz Arenas-Sordo,^a Rosa Elena Escobar-Cedillo,^b Norma Celia González-Huerta,^a Norberto Leyva-García^a y Rogelio Maldonado-Rodríguez^c

^aServicios de Genética y ^bde Electrodiagnóstico, Instituto Nacional de Rehabilitación, México D.F., México

^cDepartamento de Bioquímica, Laboratorio de Tecnología del DNA, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (ENCB), México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 28 de junio de 2007

Aceptado: 13 de julio de 2007

RESUMEN

Antecedentes: La neuropatía periférica de Charcot-Marie-Tooth (CMT) es la enfermedad hereditaria más común del sistema nervioso periférico humano. El subtipo más frecuente, CMT1A, es asociado a una duplicación de un fragmento de ~1.5 Mb en 17p11.2-p12, que incluye al gen PMP22.

Objetivo: Describir diferentes estrategias para el diagnóstico clínico y molecular de CMT1A en pacientes del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Material y métodos: A 17 pacientes estudiados clínica y electrofisiológicamente que reunieron los criterios para CMT1, se les realizó el estudio molecular mediante electroforesis capilar para detectar la duplicación del gen PMP22.

Resultados: Los estudios clínico, bioquímico y electrofisiológico ofrecieron los criterios para establecer el diagnóstico de CMT1. Con la electroforesis capilar se detectó la duplicación del gen PMP22 en siete pacientes que fueron diagnosticados clínica y electrofisiológicamente como CMT1, pudiendo llegar al diagnóstico de CMT1A. Todas las duplicaciones identificadas fueron corroboradas mediante hibridación in situ fluorescente.

Conclusión: Los resultados nos permiten asegurar que la electroforesis capilar es un método fácil y confiable para detectar la duplicación del gen PMP22. Además, el aplicar diferentes estrategias tanto clínicas, electrofisiológicas y moleculares en este tipo de pacientes, nos permitieron establecer el diagnóstico correcto y ofrecer asesoramiento genético adecuado.

Palabras clave:

Charcot-Marie-Tooth, electroforesis capilar, neuropatías periféricas hereditarias

SUMMARY

Background: Charcot-Marie-Tooth (CMT) is the most common inherited disorder of the human peripheral nerve. The most frequent subtype, CMT1A, is associated with duplication of ~1.5 Mb fragment in 17p11-p12, that includes the PMP22 gene.

Objective: The aim of this study was to describe different strategies used for clinical and molecular CMT1A diagnoses among patients attending the National Rehabilitation Institute of Mexico (INR).

Material and methods: 17 patients had clinical and electrophysiological features compatible with CMT1. A molecular study using capillary electrophoresis (CE) was performed and a PMP22 gene duplication was detected.

Results: Clinical, biochemical and electrophysiological studies constituted the inclusion criteria to establish a CMT1 diagnosis. With CE the duplication of the PMP22 gene was observable and we established a possible CMT1A diagnosis in seven patients. All duplications detected by capillary electrophoresis were corroborated using FISH.

Conclusion: CE is a feasible and reliable method to detect PMP22 gene duplication. Using different clinical, electrophysiological and molecular strategies in this patient population allowed us to establish an accurate diagnosis and offer suitable genetic counseling.

Key words:

Charcot-Marie-Tooth, capillary electrophoresis, hereditary neuropathy

Introducción

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) es el nombre que se le ha asignado a un grupo de neuropatías periféricas de origen hereditario y clínicamente heterogéneas, con una prevalencia de 1 en 2500.¹⁻³ Se divide en dos grandes tipos de acuerdo con la localización del problema en

el nervio periférico. Alrededor de dos terceras partes de las personas afectadas con CMT tienen el tipo 1 (CMT1), que afecta la capa de mielina (desmielinizante).^{3,4} Existe un amplio espectro en la gravedad 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. Los

*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Edgar Hernández-Zamora, Servicio de Genética, Instituto Nacional de Rehabilitación, Avenida México-Xochimilco 289, Arenal de Guadalupe, Deleg. Tlalpan, 14389 México D.F., México. Tel.: +52 (55) 5999-1000, extensiones 19405 y 19402. Fax: +52 (55) 5645-5603. Correo electrónico: edghernandez@inr.gob.mx

estudios electrofisiológicos ayudan a distinguir las formas desmielinizantes de las axonales al proporcionar la velocidad de neuroconducción motora, que en los pacientes con CMT1 se encuentra por debajo de los 40 m/s.⁴⁻⁹

Se han descrito diferentes variedades de este padecimiento, siendo la más frecuente el subtipo 1A (CMT1A), con una transmisión autosómica dominante asociada a una duplicación en *tandem* de un fragmento de DNA de 1.5 Mb en 17p11.2-p12.¹⁰ En esta región se encuentra el gen que codifica para la síntesis de la proteína PMP22 de 22 kDa con 160 aminoácidos, cuatro dominios hidrofóbicos transmembranales y glucosilada en el extremo aminoterminal, y que desempeña un papel importante en la compactación de la mielina, la mielinización y la regulación del crecimiento celular.¹¹⁻¹³

El gen PMP22 está constituido por cuatro exones y es regulado por dos promotores localizados hacia el extremo 5'. El origen de la duplicación que causa la enfermedad es un intercambio desigual de las cromátidas durante la meiosis; este entrecruzamiento desigual ocurre entre dos regiones que limitan al gen PMP22, denominadas REP-proximal y REP-distal, de 24 kb cada una, tomando como referencia al centrómero, las cuales tienen una homología del 98%. Dentro de cada REP se localiza una zona *hot spot* de ~1.4 Kb, donde se presenta el mayor número de mutaciones que pudieran dar origen al intercambio desigual y con ello a la duplicación de PMP22.¹³⁻¹⁵ El hallazgo de la duplicación génica o casos de pacientes con trisomías parciales, sugiere que el fenotipo de CMT1A se debe al incremento en la dosis de la expresión del gen. Se ha informado incremento en la expresión del mRNA que codifica para PMP22 en biopsias de nervio periférico de estos pacientes, sin embargo, la relación entre la elevada expresión de PMP22 y el mecanismo mediante el cual se produce la desmielinización permanece aún sin ser comprendido. Incluso, existen estudios que describen la presencia de puntos de mutación, mutaciones de novo, deleciones, apoptosis o transporte a través de la membrana, entre otros, que se han relacionado con PMP22.¹⁶⁻²⁰

El manejo adecuado de los pacientes depende de un diagnóstico temprano que permita prevenir o corregir las alteraciones que presentan. Debido a la complejidad de esta neuropatía, en México existen pocos informes al respecto.²¹

Material y métodos

Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo, en el cual se incluyeron a 17 pacientes del Instituto Nacional de Rehabilitación referidos por sospecha de neuropatía periférica, de un total de 100 pacientes atendidos en la Clínica de Enfermedades Neuromusculares entre los años 2004 y 2006. Todos los pacientes son mestizos mexicanos, con antecedente de por lo menos tres generaciones de mexicanos, la mayoría fueron casos esporádicos, originarios de la capital del país y área conurbada. Se realizaron estudios electrofisiológicos y valoración física.²² A los pacientes que reunieron los criterios clínicos y electrofisiológicos para CMT1 se les realizó el estudio molecular.

Estudio electrofisiológico

Se realizaron pruebas de velocidad de neuroconducción motora en un equipo Viking IVD Nicolet Biomedical, con un electrodo de superficie:

- En extremidades superiores, nervios mediano y cubital.
- En extremidades inferiores, nervios tibial y peroneo.

Así como de neuroconducción sensitiva:

- En extremidades superiores, nervios mediano y cubital.
- En extremidades inferiores, nervios sural y peroneo superficial.

Valorando latencia y amplitud de cada registro en forma bilateral, tomando como referencia para datos de neuropatía de tipo desmielinización segmentaria más de dos nervios afectados con velocidad de neuroconducción motora menor de 37 m/seg.

Se realizó además electromiografía convencional con aguja monopolar de 37 mm:

- En extremidades superiores bilateral, abductor de pulgar y meñique.
- En extremidades inferiores, tibial anterior, peroneo y gemelo medial.

Valorando fase de reposo y contracción voluntaria para valorar patrón neuropático.^{23,24}

Estudio clínico

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

Estudio bioquímico

Se realizaron las pruebas correspondientes al perfil muscular: creatinina fracción MB (CK-MB),²⁵ aldolasa,²⁶ lactato deshidrogenasa,²⁷ transaminasas (ALT y AST),^{28,29} fosfatasa alcalina,³⁰ empleando el protocolo de los reactivos del sistema OLYMPUSÒ (Olympus Diagnostica GmbH-Irish Branch) correspondientes a cada una de las pruebas descritas, en un equipo AU400 Chemistry Immuno Analyzer (Olympus America Inc. Diagnostic Systems Division, Melville, NY).

Estudio citogenético, hibridación *in situ* fluorescente

Para el análisis de hibridación *in situ* fluorescente se tomaron 3 mL de sangre periférica para el proceso de cultivo de linfocitos de sangre periférica que se realizó de acuerdo con la técnica convencional, con lo que se obtuvieron metafases y núcleos en interfase. Para la construcción de la sonda PMP22 se utilizaron 300 ng de DNA, se amplificó el exón 2 del gen PMP22 por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con: 50 mM KCl, 3 mM de MgCl, 200 mM de dNTPs, 0.06 de dUTPs espectro rojo (Vysis), 1 mM de iniciadores del exón 2, volumen final 50 mL. Programa: 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 60 °C y 1 minuto a 72 °C. Precipitación del producto con acetato de sodio

Cuadro I. Datos clínicos de los pacientes estudiados

Número	Sexo	Edad (años)	AHF	VNCM (m/s)	Enzimas	Pes cavus	HDMI	Sensibilidad	ROT	FISH	Examen manual muscular		
											Nervio peroneo	Tibial anterior	Otros
1	F	16	Sí	36	n	Sí	Sí	n	↓	-	3	2	3-4
2	M	11	No	42	n	Sí	Sí	n	-	+	3	4	4-5
3	F	6	No	34	n	Sí	Sí	n	↓	+	3	3	4-5
4	M	19	Sí	35	n	Sí	Sí	n	n	-	3	3	4-5
5	F	16	Sí	36	n	Sí	Sí	n	n	-	3-4	3-4	3-4
6	M	15	Sí	35	n	Sí	Sí	n	n	+	3	4	3-4
7	M	8	Sí	35	n	Sí	Sí	n	↓	-	2	4-5	4-5
8	M	46	No	35	n	Sí	No	↓	↓	+	3	3-4	3-4
9	F	8	Sí	34	n	No	Sí	↓	↓	-	3	3	3-4
10	M	12	Sí	36	n	No	Sí	↓	↓	+	3-4	3	3-4
11	F	37	Sí	36	n	Sí	Sí	↓	↓	+	3	4	3-5
12	F	10	Sí	35	n	Sí	Sí	↓	↓	-	3	4	3-5
13	F	17	Sí	35	n	No	Sí	n	-	-	3	3-4	3-4
14	M	10	No	36	n	No	Sí	↓	↓	-	3	4	3-5
15	M	15	Sí	35	n	Sí	Sí	n	n	-	4	5	5
16	M	14	No	43	n	Sí	Sí	n	n	-	4	4	4
17	M	16	No	36	n	Sí	Sí	-	-	-	3	4	3-5
C(-)	F	13	No	43	n	No	No	n	-	-	5	5	5
C(+)	M	29	Sí	35	n	Sí	Sí	↓	n	+	0	1	3-4
C(-)	M	49	No	43	n	No	No	n	-	-	5	5	5

AHF = antecedentes heredo-familiares; VNCM = velocidad de neuroconducción motora; ↓ = disminuida; n = normal; HDMI = hipotrofia distal de miembros inferiores; ROT = reflejos osteotendinosos; - = no reportado; - = negativo; + = positivo.

a 3M en etanol a 100%. Posteriormente se procedió a realizar la hibridación *in situ* basándose en los métodos descritos.^{31,32}

Estudio molecular

Se obtuvo DNA a partir de sangre periférica³³ y se realizó PCR bajo las siguientes condiciones: 50 ng de DNA genómico fueron amplificados utilizando la enzima AmpliTaq Gold™ Perkin Elmer de 5 U/μL manufacturado por Roche a una concentración final de 0.04 U, MgCl₂ 3mM, regulador 1X, dNTP's 0.4 mM, 0.2 μM de cada iniciador, agua en un volumen final de 20 μL. Los iniciadores para amplificar el exón 2 del gene PMP22 (155 pb) descrito por Lupski y el exón 51 (388 pb) del gen de la distrofina descrito por Chamberlain como control interno.^{10,34-36}

Los iniciadores *forward* fueron modificados en el extremo 5' mediante la aplicación de una marca fluorescente de HEX™ (hexaclorofluoresceína, Applied Biosystems). Las muestras fueron amplificadas en un equipo GeneAmp PCR System 9700 PE Applied Biosystems, 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55°C, 2 minutos a 68°, con una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94 °C, y una extensión final de 5 minutos a 68 °C. Todas las amplificaciones se realizaron con un blanco sin DNA.³⁷

Electroforesis capilar

Para la electroforesis capilar se utilizó un equipo ABI PRISM 310 Genetic Analyzer PE (Applied Biosystems, Foster City, Ca), con un capilar de 47 cm (punto verde), el cual fue llenado

con polímero POP-4 (Performance Optimizer Polymer).

Preparación de las muestras: 2 μL de producto de PCR en tubos de 250 μL, 5 μL de marcador de Gene Scan™- 500 size standard ABI PRISM (TAMRA 500). Desnaturalización 7 minutos a 98 °C; y posteriormente 10 minutos a 4 °C.

Condiciones utilizadas en la electroforesis capilar: tiempo de inyección de 5 segundos, voltaje de 15 kV, temperatura de 60 °C, tiempo de 26 minutos. En cada determinación se incluyó una muestra de TAMRA 500 sin producto de PCR como blanco, y una prueba de color para comprobar el adecuado funcionamiento del equipo, protocolo de uso recomendado por Applied Biosystems.³⁸⁻⁴⁵

Resultados

Del total de los 100 pacientes con enfermedades neuromusculares, 20% correspondieron a pacientes con diagnóstico de neuropatías y de éstos, 85% (17 pacientes) fueron diagnosticados con enfermedad de CMT. En el Cuadro I se muestran las características clínicas y electrofisiológicas de los pacientes estudiados con diagnóstico de CMT1. El 76.5% (13 pacientes) presentó pies cavos y en varo.

En la figura 1 se presentan las gráficas de velocidad de neuroconducción motora en nervios peroneos (derecho e izquierdo) de un control negativo y de un control positivo para CMT1A; el 88.2% (15 pacientes) presentó disminución de la velocidad de neuroconducción motora, el promedio fue de 36.118 y la desviación estándar de 2.497, muy similar a lo descrito en la literatura (Cuadro I).⁴⁶

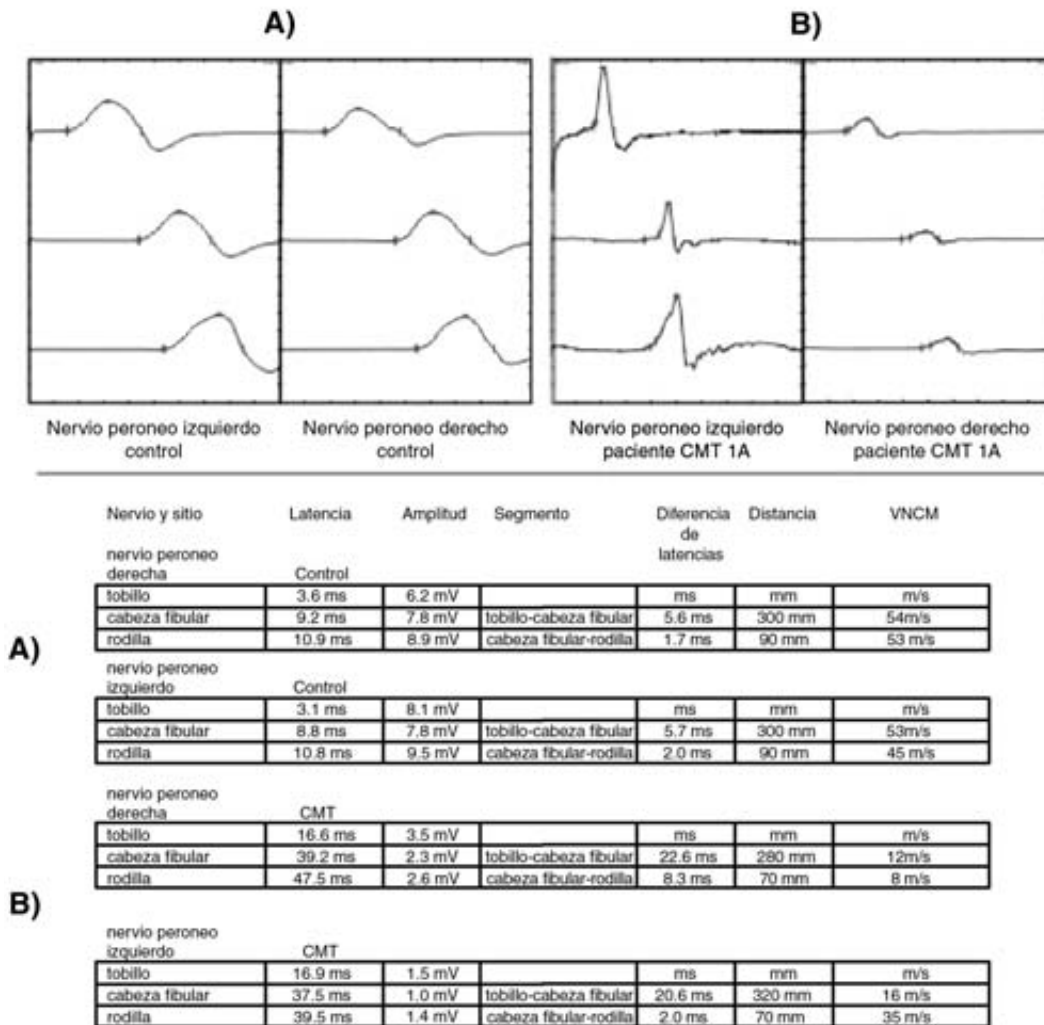


Figura 1. Velocidad de neuroconducción motora (VNCM). A) Control negativo; B) control positivo.

Para realizar la electroforesis capilar se amplificaron en un PCR dúplex los exones, 2 de PMP22 y 51 de DMD, se incluyó una muestra de TAMRA 500 sin producto de PCR como marcador de peso molecular. Se obtuvieron datos con el programa Gene Scan para un control negativo y para un control positivo con diagnóstico clínico, electrofisiológico y citogenético de CMT1A. Todas las duplicaciones identificadas por electroforesis capilar fueron corroboradas por hibridación *in situ* fluorescente [Figura 2, control positivo (3 marcas, izquierda) y control negativo (dos marcas, derecha)].

La figura 3A muestra el electroferograma de un pacientes sin duplicación y la figura 3B, de un paciente con duplicación. En la figura 4 se presentan los valores de proporción relativa entre el exón 2 de PMP22 y el exón 51 de DMD, del total de los pacientes del estudio y cómo se determinó la presencia de la duplicación de PMP22, con los datos de la tabla que aparece en esta misma figura.

Los pacientes que acudieron al Instituto Nacional de Rehabilitación se quejaban de los llamados defectos postu-

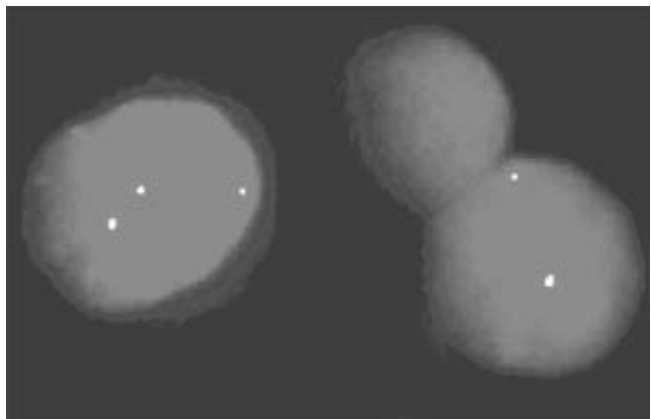


Figura 2. En la imagen izquierda se observa un núcleo en interfase de un individuo con tres marcas fluorescentes, lo que implica tres copias del gen PMP22. En la de la derecha se muestran dos copias del gen normal.

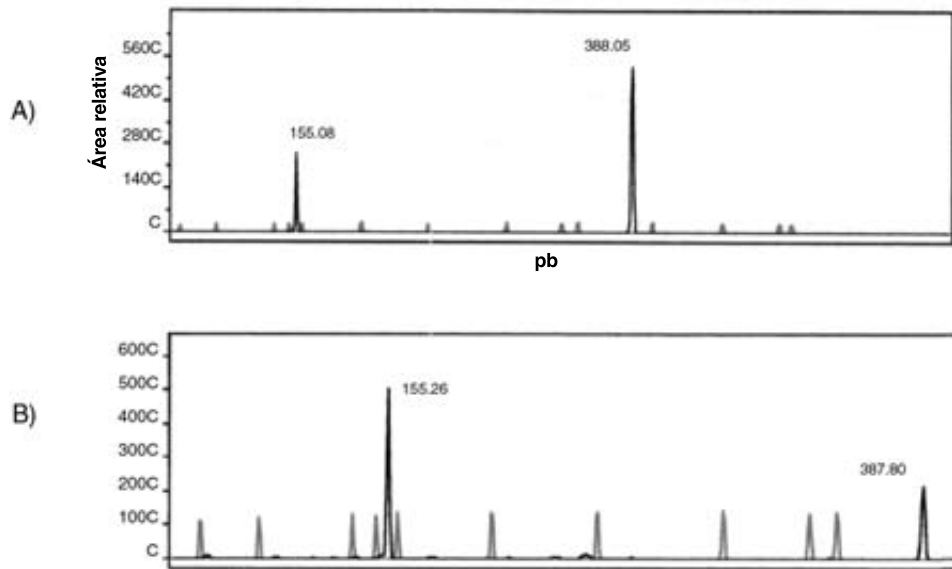


Figura 3. Electroferograma de A) paciente negativo (normal); B) paciente positivo para CMT1A.

rales; en la exploración física se encontró que 94.1% (16 pacientes) presentaron hipotrofia de algunos grupos musculares (principalmente distal de miembros inferiores). Todos los sujetos del estudio presentaron fuerza muscular disminuida en peroneos, tibial anterior y, dependiendo el caso, en lumbricales e interóseos de las manos e incluso en algunos otros músculos, dependiendo del tiempo de evolución y gravedad del padecimiento. Los reflejos osteotendinosos se encontraron disminuidos en 23.5% (4 pacientes), y la sensibilidad cutánea, en 23.5% (4 pacientes). El 76.5% (13 pacientes) tuvo deformidades características, como pie cavo. Todas las características mencionadas forman parte del diagnós-

tico clínico. También se realizó el árbol genealógico en todos los casos. El Cuadro I describe los datos clínicos más relevantes. El 88.2% (15 pacientes) presentó una velocidad de neuroconducción motora menor a 37 m/s, principalmente en los nervios peroneos (Figura 1).

Discusión

La contribución del estudio neurofisiológico al diagnóstico de la enfermedad de CMT1 cuya prueba principal es la determinación de la velocidad de neuroconducción motora

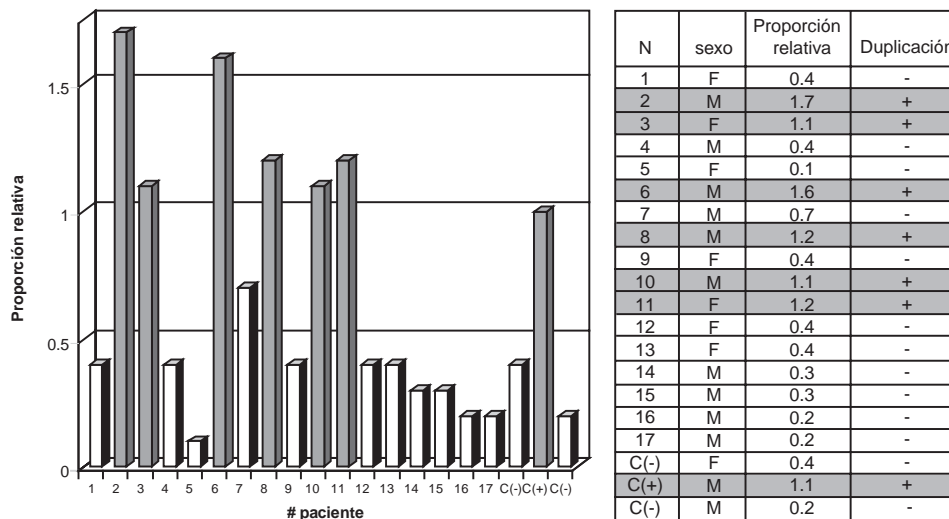


Figura 4. Proporción relativa entre el exón 2 de PMP22 y el exón 51 de DMD en cada uno de los pacientes estudiados.

es muy útil en la clínica, sin embargo, se ha demostrado que estos estudios varían según la gravedad y la etapa de la enfermedad. El llamado rango intermedio de los valores de velocidad de neuroconducción motora (30-38 m/s) no necesariamente implica que se trate de una neuropatía desmielinizante (CMT1A), pues también se ha descrito en algunos tipos de neuropatías axonales e incluso en las desmielinizantes que estos valores pueden ser normales; sin embargo, sigue siendo una herramienta importante para una primera impresión diagnóstica, por lo cual se considera sólo una de las diferentes estrategias del diagnóstico integral.⁴⁶⁻⁴⁸

La biopsia muscular y de nervio (microscopia de luz y microscopia electrónica) aporta más evidencias, pero no siempre permite apreciar características particulares debido a la zona donde se extrae la muestra, además, se trata de un método invasivo, el cual no siempre es posible realizar, a menos que el paciente sea intervenido quirúrgicamente, razón por la que no informamos datos histopatológicos.⁴⁹

A todos los pacientes se les realizó historia clínica y 64.7% (11 pacientes) presentaron antecedentes heredofamiliares, lo cual en los casos que presentaron duplicación del gen PMP22, junto con otros aspectos clínicos, proporciona datos del tipo de herencia, muy probablemente autosómica dominante; sin embargo, los pacientes 2, 3 y 8 no presentaron antecedentes heredofamiliares, aun cuando fueron positivos a la duplicación de PMP22 y pueden clasificarse como pacientes con CMT1A. Posiblemente, como lo indican diferentes reportes en la literatura, el fenotipo CMT1A puede estar relacionado también con la presencia de puntos de mutación o deleciones, ambas de *novus*, en el gen PMP22, por lo que no se encontrarían antecedentes heredofamiliares.⁵⁰

Los aspectos clínicos son fundamentales para tener la impresión diagnóstica de CMT, sin embargo para definir el tipo de CMT es indispensable realizar estudios moleculares, ya que la variabilidad fenotípica es muy frecuente y puede condicionar errores diagnósticos de los diferentes tipos y subtipos.⁴⁶

Para la detección específica de la duplicación se han utilizado diferentes herramientas moleculares como el estudio de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica, electroforesis en gel de campos pulsados y PCR, utilizando un grupo de marcadores polimórficos de GT, CA y de AC contenidos en la duplicación génica,^{51,52} hibridación *in situ* fluorescente^{31,32} y PCR en tiempo real cuantitativo,⁵³ entre otras. En este trabajo el análisis mediante hibridación *in situ* fluorescente permitió observar en el control negativo dos marcas correspondientes a PMP22 y 3 marcas del control positivo para CMT1A. Todas las duplicaciones detectadas por electroforesis capilar fueron corroboradas mediante la prueba de hibridación *in situ* fluorescente (Cuadro I y Figura 2).

El estudio molecular mediante electroforesis capilar, como fue sugerido por Yau en 1996³⁹ y por Lin en 2006, con pacientes de CMT1A,⁵⁴ nos permitió detectar la duplicación de manera rápida y confiable. Los controles utilizados permitieron identificar los picos correspondientes a los exones 2 de PMP22 y 51 de DMD, que se empleó como control interno. En el individuo control negativo (sano), el pico del exón 51 fue de un tamaño mucho mayor que el del exón 2; de manera

contraria, el exón 2 fue mayor en el caso del control positivo. En los pacientes encontramos que 41.2% (7 pacientes) presentaron duplicación de PMP22, lo que permitió establecer el diagnóstico de CMT1A (Figura 3). Mediante el análisis Gene Scan determinamos las áreas relativas encontradas en los picos determinados y establecimos proporciones de éstos, entre el correspondiente al exón 2 de PMP22 y el 51 de DMD de cada uno de los pacientes, para finalmente graficar la relación de proporciones en los individuos con y sin duplicación de PMP22 (Figura 4).

Finalmente es necesario analizar otros genes implicados en la génesis de este tipo de neuropatías, como MPZ y EGR2, para tener la certeza diagnóstica y así poder descartar los subtipos de neuropatías CMT1. Además, se conoce que existe gran variabilidad clínica independientemente del tipo de mutación o del gen afectado, que el mismo defecto génico produce distintos cuadros clínicos incluso en la misma familia, y que también existe la participación de otros factores, ya sean ambientales o epigenéticos, que interactúan en la patogénesis de la enfermedad. Por lo antes expuesto, es fundamental realizar un estudio integral que incluya diferentes estrategias tanto clínicas, electrofisiológicas y moleculares en este tipo de pacientes, para establecer un diagnóstico correcto y así ofrecer un asesoramiento genético adecuado.⁵⁵

Agradecimientos

El primer autor realizó esta investigación para obtener el grado de doctor en el programa de posgrado de la ENCB, y recibió beca del CONACYT.

Referencias

1. Salamanca-Gómez F. Avances en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas. *Gac Med Mex* 2001;137:487-488.
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. Sevilla T. Genética de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 1, de las neuropatías focales hereditarias y de las neuropatías hereditarias motoras distales. *Rev Neurol* 2000;30:71-79.
4. Nodera H, Bostock H, Kuwabara S, Sakamoto T, Asanuma K, Jia-Ying S, et al. Nerve excitability properties in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* 2004;127:203-211.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Amo-Usanos C, Martín-Jiménez S, Basurte-Villamor P, Puente-Muñoz AI, Amo-Merino P, Amo-Usanos I, et al. Sobre el diagnóstico de las neuropatías periféricas: estudio clínico y neurofisiológico. *Rev Neurol* 2001;32:123-126.
9. Berghoff C, Berghoff M, Leal A, Morera B, Barrantes R, Reis A, et al. Clinical and electrophysiological characteristics of autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease (ARCMT2B) that maps to chromosome 19q13.3. *Neuromuscul Disord* 2004;14:301-306.
10. Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, et al. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 1991;66:219-232.
11. Hanemann CO, Stoll G, D'Urso D, Fricke W, Martin JJ, Van Broeckhoven C, et al. Peripheral myelin protein-22 expression in Charcot-Marie-

- Tooth disease type 1a sural nerve biopsies. *J Neurosci Res* 1994;37:654-659.
12. **Marques WJ, Sweeney MG, Wood NW.** Thr(118)Met amino acid substitution in the peripheral myelin protein 22 does not influence the clinical phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A due to the 17p11.2-p12 duplication. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:1403-1407.
 13. **Suter U, Moskow JJ, Welcher AA, Snipes GJ, Kosaras B, Sidman RL, et al.** A leucine-to-proline mutation in the putative first transmembrane domain of the 22-kDa peripheral myelin protein in the trembler-J mouse. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:4382-4386.
 14. **Suter U, Snipes GJ, Schoener-Scott R, Welcher AA, Pareek S, Lupski JR, et al.** Regulation of tissue-specific expression of alternative peripheral myelin protein-22 (PMP22) gene transcripts by two promoters. *J Biol Chem* 1994;269:25795-25808.
 15. **Suter U, Welcher AA, Ozcelik T, Snipes GJ, Kosaras B, Francke U, et al.** Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene. *Nature* 1992;356:241-244.
 16. **Niemann S, Sereda MW, Suter U, Griffiths IR, Nave KA.** Uncoupling of myelin assembly and schwann cell differentiation by transgenic overexpression of peripheral myelin protein 22. *J Neurosci* 2000;20:4120-4128.
 17. **Chies R, Nobbio L, Edomi P, Schenone A, Schneider C, Brancolini C.** Alterations in the Arf6-regulated plasma membrane endosomal recycling pathway in cells overexpressing the tetraspan protein Gas3/PMP22. *J Cell Sci* 2003;116:987-999.
 18. **Sancho S, Young P, Suter U.** Regulation of Schwann cell proliferation and apoptosis in PMP22-deficient mice and mouse models of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* 2001;124:2177-2187.
 19. **Robertson AM, Perea J, McGuigan A, King RH, Muddle JR, Gabreels-Festen AA, et al.** Comparison of a new pmp22 transgenic mouse line with other mouse models and human patients with CMT1A. *J Anat* 2002;200:377-390.
 20. **Reiter LT, Murakami T, Koeuth T, Gibbs RA, Lupski JR.** The human COX10 gene is disrupted during homologous recombination between the 24 kb proximal and distal CMT1A-REPs. *Hum Mol Genet* 1997;6:1595-1603.
 21. **Cruz-Medina E, Soria-Batida MA.** Resúmenes de los trabajos de investigación presentados en la XVI Jornadas Nacionales de Médicos Residentes en Medicina de Rehabilitación: Número de casos nuevos de enfermedades neuromusculares atendidos en el Centro Nacional de Rehabilitación y Ortopedia, Instituto Nacional de Neurología y Hospital Infantil de México. *Rev Mex Med Fis Rehab* 2000;12:6-9.
 22. **Papazian O, Alfonso I, García F.** Evaluación neurofisiológica de los niños con neuropatías periférica. *Rev Neurol* 2002;35:254-268.
 23. **Dumitru D.** *Electrodiagnostic medicine.* Philadelphia: Hanlel & Belfus, Inc.; 2001.
 24. **DeLisa JA, Lee HJ, Baran EM, Lai KS, Spielholz.** *Manual of nerve conduction velocity and clinical neurophysiology.* 3a. ed. New York: Raven Press; 1994.
 25. **Szasz G, Gerhardt W, Gruber W.** Creatine kinase in serum: 3. Further study of adenylate kinase inhibitors. *Clin Chem* 1977;23:1888-1892.
 26. **Kasamatsu T.** Studies on the serum aldolase activity in workers with muscle disorders caused by vibration work. *Sangyo Igaku* 1983;25:493-502.
 27. **Amador E, Dorfman LE, Wacker WE.** Serum lactic dehydrogenase activity: an analytical assessment of current assays. *Clin Chem* 1963;12:391-399.
 28. **Wroblewski F, LaDue JS.** Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac with hepatic disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956;91:569-571.
 29. **Saris NE.** International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). The role of the IFCC-section in Clinica Chimica Acta. *Clin Chim Acta* 1975;61:F1.
 30. **Bowers GN J, McComb RB.** Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin Chem* 1975;21:1988-1995.
 31. **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;69:325-331.
 32. **Verma RS, Babú A.** *Human chromosomes: Manual of basic techniques.* New York: Pergamon Press; 1989. pp. 5-9.
 33. **Buffone GJ, Darlington GJ.** Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin Chem* 1985;31:164-165.
 34. **Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT.** Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988;16:11141-11156.
 35. **Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Caskey CT.** *Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy.* EUA: Academic Press; 1990.
 36. **Roa BB, García CA, Pentao L, Killian JM, Trask BJ, Suter U, et al.** Evidence for a recessive PMP22 point mutation in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1993;5:189-194.
 37. **Roa BB, García CA, Suter U, Kulpa DA, Wise CA, Mueller J, et al.** Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Association with a spontaneous point mutation in the PMP22 gene. *N Engl J Med* 1993;329(2):96-101.
 38. **Castagnino JM.** Electroforesis capilar. *Bioquímica* 2000;25:13-32.
 39. **Yau SC, Bobrow M, Mathew CG, Abbs SJ.** Accurate diagnosis of carriers of deletions and duplications in Duchenne/Becker muscular dystrophy by fluorescent dosage analysis. *J Med Genet* 1996;33:550-558.
 40. **Lynn AM, Jain CK, Kosalai K, Barman P, Thakur N, Batra H, et al.** An automated annotation tool for genomic DNA sequences using GeneScan and BLAST. *J Genet* 2001;80:9-16.
 41. **Pereira-Vianello BR, Grattapaglia D.** Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. *Biotechniques* 2001;31:793-800.
 42. **Bhattacharya A, Bhattacharya S, Joshi A, Ramachandran S, Ramaswamy R.** Identification of parasitic genes by computational methods. *Parasitol Today* 2000;16:127-131.
 43. **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.
 44. **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.
 45. **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.
 46. **Sevilla T, Vilchez JJ.** Different phenotypes of Charcot-Marie-Tooth disease caused by mutations in the same gene. Are classical criteria for classification still valid? *Neurologia* 2004;19:264-271.
 47. **Palau F, Cuesta A, Pedrola L.** Avances en la genética molecular de las neuropatías hereditarias. *Rev Neurol* 2002;35:246-253.
 48. **López-Pison J, Rebage V, Baldellou-Vázquez A, Capablo-Liesa JL, Colomer J, Calvo MT, et al.** Hereditary neuromuscular diseases in paediatrics. Our experience over the last 14 years. *Rev Neurol* 2005;41:145-150.
 49. **Salinero-Paniagua E, Esteban-García A, Traba A, Palencia-Herrejón E, Garzo-Fernández C, Prieto-Montalvo J.** Modified aspiration needle muscular biopsy in neuromuscular diseases. Use and advantages over open surgical biopsy. *Rev Neurol* 2004;39:821-825.
 50. **Blair IP, Nash J, Gordon MJ, Nicholson GA.** Prevalence and origin of the novo duplications in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: First report of a de novo duplication with a maternal origin. *Am J Hum Genet* 1996;58:472-476.
 51. **Xiao J, Tang B, Xia J.** PCR in the gene diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2001;81:138-141.
 52. **Potocki L, Chen KS, Park SS, Osterholm DE, Withers MA, Kimonis V, et al.** Molecular mechanism for duplication 17p11.2- the homologous recombination reciprocal of the Smith-Magenis microdeletion. *Nat Genet* 2000;24:84-87.
 53. **Choi JR, Lee WH, Sunwoo IN, Lee EK, Lee CH, Lim JB.** Effectiveness of real-time quantitative PCR compare to repeat PCR for the diagnosis of Charcot-Marie-Tooth Type 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Yonsei Med J* 2005;46:347-352.
 54. **Lin CY, Su YN, Lee CN, Hung CC, Cheng WF, Lin WL, et al.** A rapid and reliable detection system for the analysis of PMP22 gene dosage by MP/DHPLC assay. *J Hum Genet* 2006;51:227-235.
 55. **Grandis M, Shy ME.** Current Therapy for Charcot-Marie-Tooth Disease. *Curr Treat Options Neurol* 2005;7:23-31.