Revista Médica del Hospital General de México

Volumen *Volume* 66 Número *Number* 4 Octubre-Diciembre *October-December* 2003

Artículo:

Detección de la duplicación génica de PMP22 mediante hibridación *in situ* en pacientes con Charcot-Marie-Tooth 1A

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Sociedad Médica del Hospital General de México, AC

Otras secciones de este sitio:

- Índice de este número
- Más revistas
- Búsqueda

Others sections in this web site:

- *Contents of this number*
- *More journals*
- *Search*

Medigraphic.com

Artículo original

Trabajo de investigación

REVISTA MEDICA DEL
HOSPITAL GENERAL
DE MEXICO, S.S.

Vol. 66, Núm. 4 • Oct.-Dic. 2003
pp 187 - 191

Detección de la duplicación génica de PMP22 mediante hibridación *in situ* en pacientes con Charcot-Marie-Tooth 1A

Leyva-García N,* González Huerta NC, Hernández Zamora E,* Kofman S, Bautista Tirado MT,* Gálvez Rosas A,* Cuevas-Covarrubias SA****

RESUMEN

La neuropatía periférica Charcot-Marie-Tooth (CMT) es una enfermedad genéticamente heterogénea con prevalencia de 1 en 2,500 recién nacidos vivos. Existen distintos subtipos, dependiendo de sus características clínicas y moleculares. Alrededor de nueve loci se han asociado con la presencia de este tipo de neuropatías degenerativas; CMT1A es la más común y se hereda en forma autosómica dominante, siendo causada en su mayoría por duplicaciones del gen PMP22 ubicado en 17p11.2-p12. En el presente trabajo se analizaron 12 pacientes con CMT1 de familias no relacionadas mediante FISH para la región PMP22. Se observó la duplicación de PMP22 en tres de los 12 sujetos, estableciéndose el diagnóstico de CMT1A. Los nueve casos restantes no presentaron la duplicación, lo cual señala la importancia de realizar el diagnóstico molecular correcto en estos padecimientos en nuestra población para ofrecer un asesoramiento genético adecuado.

Palabras clave: CMT1A, duplicación PMP22, fluorescencia *in situ*, neuropatía periférica, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

ABSTRACT

Charcot-Marie-Tooth (CMT) is an entity with genetic heterogeneity. It has a prevalence of 1 in 2,500 NB and classifies in several groups according to the clinical and molecular characteristics. About nine loci have been associated with this type of neuropathies. CMT is an autosomal dominant neuropathy and is most caused by duplication of PMP22 gene on chromosome 17p11.2-p12. In the present study we analyzed 12 CMT1 non-related subjects through FISH of the PMP22 region. We found in 3 cases the duplication of PMP22 corroborating the CNT1 diagnosis. The absence of the duplication of the PMP22 region in the rest of patients, remarks the importance of establishing the molecular studies to correctly diagnose the genetic entities and offer and adequate genetic counseling.

Key words: *CMT1A, PMP22 duplication, FISH, peripheral neuropathy, Charcot-Marie-Tooth disease.*

ANTECEDENTES

La neuropatía hereditaria motor-sensorial o enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) es un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas con una incidencia de 1 en 2,500.[1] La mayoría tienen un patrón de herencia autosómico dominante; sin embargo, también se presentan las formas autosómica recesiva y recesiva ligada al cromosoma X *(Cuadro I)*. 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. La mayoría de los enfermos presentan alteraciones en la deambulación. La edad de presentación depende del tipo de CMT, pero fre-

* Servicio de Genética, Centro Nacional de Rehabilitación-Ortopedia, Secretaría de Salud (SS).
** Departamento de Genética, Hospital General de México, SS-UNAM.

cuentemente es en la segunda década de la vida. Los signos iniciales incluyen dificultad para caminar y subir escaleras; al aumentar la gravedad, los pacientes compensan este problema, flexionando la cadera a cada paso, dando una marcha en equino. El estudio de electromiografía (EMG) ayuda a distinguir las formas desmielinizantes de las axonales y proporciona las velocidades de conducción motora que en los pacientes con CMT1 se encuentra por debajo de los 40 m/s.[2]

Histológicamente, la biopsia de nervio revela la formación de láminas concéntricas de material mielínico alrededor de la fibra nerviosa debido a la desmielinización y remielinización; este hallazgo se conoce como "bulbos de cebolla", los cuales son la causa subyacente del engrosamiento de los nervios periféricos.[3,4]

En la mayoría de los casos, la enfermedad de CMT1A se debe a una duplicación de ADN en tandem de 1.5 Mb localizada en el cromosoma 17p11.2-p12.[5] Esta región está flanqueada por dos secuencias repetidas mayores de 17 kb, denominadas CMT1A-REP proximal y CMT1A-REP distal, ambas con un 98% de homología.[6] Al parecer, la duplicación es regulada por un transposón (elemento génico que tiene la capacidad de transposición)[7] localizado cerca de un punto de mayor predisposición a mutaciones (hotspot) en el evento de recombinación.[8] El hallazgo de la duplicación génica o casos de pacientes con trisomías parciales que involucran la región de 1.5 Mb, que contiene al gen PMP22, sugiere que el fenotipo de CMT1A se debe al incremento en la dosis de la expresión del gen.[9,10] La duplicación se en-

Cuadro I. Neuropatías periféricas hereditarias, genes asociados y patrón de herencia.

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

edigraphic.com

Cuadro II. Características de los pacientes estudiados.

Núm.	*Edad (años)*	*Sexo*	*VCM m/s*	*Deformidad*	*FISH*
1	10	F	25	Cavo-varo	Normal
2	10	M	16	Equino-varo	Dup
3	14	F	27	Cavo	Normal
4	5	F	25	Equino-varo	Normal
5	10	M	25	Cavo-varo	Normal
6	8	M	15	Cavo-varo	Dup
7	27	F	18	Cavo	Dup
8	18	M	22	Cavo-varo	Normal
9	13	M	27	Cavo	Normal
10	17	M	22	Cavo-varo	Normal
11	15	F	25	Cavo	Normal
12	18	M	18	Cavo-varo	Normal

Abreviaturas: M = Masculino. F = Femenino.

cuentra en 70% de los casos heredados y en 90% de los casos esporádicos. El gen PMP22 fue caracterizado a partir de la purificación de transcritos extraídos de células de Schwann en biopsias del nervio ciático y de bibliotecas genómicas de la médula espinal de fetos humanos y codifica para una proteína mielinperiférica. PMP22 contiene seis exones, de los cuales dos no se traducen y dos son promotores alternativos que se encuentran adyacentes río arriba; su expresión es tejido-específica en nervio periférico, aunque también se ha observado su expresión en tejidos distintos al nervioso. El análisis de la secuencia primaria de PMP22 muestra que el promotor 1 es similar a todos los promotores tejido-específico con una caja TATA a 30 pb de distancia río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Existe también una secuencia invertida CCAAT río arriba de la caja TATA. El promotor 2 muestra características similares a los genes de "mantenimiento" y no presenta una caja TATA específica; sin embargo, se observa un alto contenido GpC 352 pb, río arriba del sitio inicial de la transcripción.[11]

No existen estudios moleculares en nuestra población en este tipo de padecimientos, por lo que el objetivo de este estudio fue identificar el número de casos con duplicación del gen PMP22 en una muestra de pacientes mexicanos con CMT1.

MATERIAL Y MÉTODOS

Fueron estudiados 12 pacientes con diagnóstico clínico, electromiográfico y de histopatología compatible con CMT1. El proyecto fue aprobado por el Comité de Investigación del Centro Nacional de Rehabilitación-Ortopedia de la Secretaría de Salud. Los pacientes fueron informados del estudio y aceptaron participar. Las características clínicas se muestran en el *cuadro II*.

Para el análisis de FISH se tomaron 3 mL de sangre periférica mediante punción de la vena antecubital. El proceso de cultivo de linfocitos de sangre periférica se realizó de acuerdo a 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 ADN genómico como templete, se amplificó el exón 2 del gen PMP22 por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizó un volumen total de 50 mL, que contenía: 1x de 10 mM Tris, 50 μM KCl, 3 mM de MgCl, 200 μM de dNTPs más 0.06 de dUTPs espectro rojo (Vysis), 1 μM, de los oligonucleótidos específicos del exón 4. Los tiempos de amplificación fueron: un minuto 94º C, un minuto 60º C y un minuto a 72º C por 35 ciclos. Se procedió a la precipitación del producto en una solución de acetato de de sodio a 3M y etanol al 100%. Posteriormente, se procedió a realizar la hibridación *in situ* en base a los métodos descritos.[12]

edigraphic.com

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fueron estudiados 12 sujetos: siete hombres y cinco mujeres. Tres de los pacientes presentaron la duplicación de PMP22 identificada mediante FISH *(Figuras 1 y 2)*, lo que representa 25% de los 12 ca-

sos analizados. De estos enfermos, dos fueron hombres y una mujer; los tres tenían una disminución importante de las VCM que se encontraba por debajo de los 20 m/s además de presentar una afección clínica grave.

El mecanismo de formación de las duplicaciones se ha estudiado en forma experimental en bacterias, levaduras y en la mosca de la fruta, observando que la generación de este tipo de duplicaciones se debe a una recombinación homóloga desigual entre secuencias génicas similares.[13] Para la detección de la duplicación, se han utilizado diferentes herramientas moleculares como son el estudio de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs), electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando un set de marcadores polimórficos de GT, CA y de AC contenidos en la duplicación génica.[14] El análisis molecular mediante FISH permite observar directamente la duplicación y detectar incluso posibles casos de mosaicismo somático, analizando núcleos en interfase de linfocitos de sangre periférica, por lo que resulta un método de elección adecuado en estos casos.[15,16] En el presente trabajo encontramos solamente 25% de casos con la duplicación de PMP22, lo que nos permitió establecer el diagnóstico de CMT1A. Aun cuando la muestra no fue muy grande, este pequeño porcentaje de casos afectados con la duplicación de PMP22 diferiría a lo reportado en la literatura, ya que la forma CMT1A con esta duplicación es la más frecuente. Considerando estudios previos, se esperaría encontrar cuando menos seis o siete casos con CMT1A en la muestra analizada, por lo que es importante estudiar una población más grande para confirmar este hallazgo. Por otro lado, es necesario analizar los otros genes implicados en la génesis de este tipo de neuropatías, como son MPZ, Cx y EGR2, para tener la certeza diagnóstica y así poder descartar los subtipos de neuropatías CMT1. Uno de los aspectos interesantes del CMT1A representa la "ganancia de función" como consecuencia en la mayoría de los casos de la duplicación génica. El exceso de expresión produce un aumento en la concentración de la proteína PMP22, desestabilizando el proceso de mielogénesis. Pocas entidades son consecuencia de la presencia de tres alelos. Cabe mencionar que no sólo las duplicaciones del gen PMP22 producen la enfermedad, ya que también se han reportado mutaciones puntuales, especialmente en los dominios transmembranales.

Figura 1. *Linfocito en interfase de un paciente con CMT1A donde se aprecian tres copias del gen PMP22, lo cual indica la duplicación.*

Figura 2. *Linfocito en interfase de un control sano donde se aprecian dos copias del gen PMP22.*

Otro de los aspectos importantes es la gran variabilidad clínica informada en la literatura, independientemente del tipo de mutación o del gen afectado, ya que el mismo defecto génico produce distintos cuadros clínicos incluso en la misma familia, lo que resalta la participación de otros factores, ya sean ambientales o epigenéticos, interactuando en la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, en nuestra muestra analizada, los pacientes con la duplicación del gen PMP22 presentaron las manifestaciones clínicas más graves. En conclusión, es fundamental realizar un estudio integral que incluya aspectos clínicos y moleculares en este tipo de pacientes en nuestra población para establecer un diagnóstico correcto y así poder ofrecer un asesoramiento genético adecuado.

www.medigraphic.com

BIBLIOGRAFÍA

1. Dyck PJ, Oviatt KF, Lambert EH. Intensive evaluation of referred unclassified neuropathies yields improved diagnosis. *Ann Neurol* 1981; 10: 222-226.
2. Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth´s disease. *Clin Genet* 1974; 6: 98-118.
3. Dyck PJ, Chance PF, Levo RV, Carney JA. *Hereditary motor and sensory neuropathies. Peripheral neuropathy*. 3nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1992; 1094-1136.
4. Lupski JR, Garcia CA. Charcot-Marie Tooth peripheral neuropathies and related disorders. In: Scriver RC, Beaudet LA, Sly SW, Valle D. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8th ed. New York, NY: McGraw-Hill, 2001; 5759-5779.
5. Timmerman V, Raeymaekers P, De Jonghe P, De Winter G, Swerts L, Jacobs K et al. Assignment of of the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1 (CMT1 gene to 17p11.2-p12. *Am J Hum Genet* 1990; 47: 680-685.
6. Wise CA, García CA, Davis SN, Heju Z, Pentao L, Patel PI, Lupski JR. Molecular analyses of unrelated Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease patients suggest a high frequency of the CMT1A duplication. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 853-63.
7. Reiter LT, Murakami T, Koeuth T, Pentao L, Muzny DM, Gibbs RA, Lupski JR. A recombination hotspot responsible for two inherited peripheral neuropathies is located near a mariner transposon-like element. *Nat Genet* 1996; 12: 288-297.
8. Pentao L, Wise CA, Chinault AC et al. Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication appears to arise from recombination at repeat sequences flanking the 1.5 mb monomer unit. *Nat Genet* 1992; 2: 292-300.
9. Han L.-L, Keller MP, Navidi W, Chance PF, Arnheim N. Unequal exchange at the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A recombination hot-spot is not elevated above the genome average rate. *Hum Molec Genet* 2000; 9: 1881-1889.
10. Roa BB, García CA, Wise CA, Anderson K et al. Gene dosage as a mechanism for a common autosomal dominant peripheral neuropathy: Charcot-Marie-Tooth disease type 1a. In: Epstein CJ (ed). *The phenotypic mapping of Down Syndrome and other aneuploid conditions* (Progres Clin Biol Res 1993; vol 384) New York: Wiley-Liss, 187-205.
11. Vallat JM, Sindou P, Preux PM, Tabaraud, Milor AM, Couratier P et al. Ultrastructural PMP22 expression in inherited demyelinating neuropathies. *Ann Neurol* 1996; 39: 813-817.
12. Verma RS, Babú A. *Human chromosomes: Manual of basic techniques*. New York: Pergamon Press, 1989; 5-9.
13. Lopes J, Tardieu S, Silander K, Blair I, Vandenberghe A, Palau F et al. Homologous DNA exchanges in humans can be explained by the yeast double-strand break repair model: A study of 17p11.2 rearrangements associated with CMT1A and HNPP**.** *Hum Mol Genet* 1999; 8: 285-2292.
14. Han L-L, Keller MP, Navidi W, Chance PF, Arnheim N. Unequal exchange at the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A recombination hot-spot is not elevated above the genome average rate. *Hum Molec Genet* 2000; 9: 1881-1889,.
15. 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.
16. Rautenstrauss B, Liehr T, Fuchs C, Bevot A, Bornemann A, Postler E et al. Mosaicism for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: Onset in childhood suggests somatic reversion in early developmental stages. *Int J Mol Med* 1998; 1: 333-337.

Dirección para correspondencia:

Sergio Cuevas C.
Servicio de Genética
Hospital General de México
E-mail: sergioa@servidor.unam.mx

edigraphic.com