



**DESCRIPCIÓN CLÍNICA Y GENÉTICA DE LOS PACIENTES CON  
DIAGNÓSTICO DE CHARCOT-MARIE-TOOTH EN EL ÁREA DE ALICANTE  
E IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS MUTACIONES EN CMT1**

TESIS DOCTORAL

Maria Empar Blanco Cantó

DIRECTOR: Hugo Cabedo Martí

CODIRECTORA: Carmen Díaz Marín

**Programa de Doctorado en Neurociencias**

**INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS**

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**

**- 2021 -**







La presente Tesis Doctoral, titulada “DESCRIPCIÓN CLÍNICA Y GENÉTICA DE LOS PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE CHARCOT-MARIE-TOOTH EN EL ÁREA DE ALICANTE E IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS MUTACIONES EN CMT1”, se presenta bajo la modalidad de **tesis convencional** con el siguiente indicio de calidad:

- Blanco-Cantó ME, Patel N, Velasco-Aviles S, Casillas-Bajo A, Salas-Felipe J, García-Escrivá A, Díaz-Marín C, Cabedo H. Novel EGR2 variant that associates with Charcot-Marie-Tooth disease when combined with lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  factor T49M polymorphism. *Neurol Genet.* 2020 Mar 3;6(2):e407. doi: 10.1212/NXG.0000000000000407. PMID: 32337334; PMCID: PMC7164973.





Sant Joan d'Alacant, 2021

El Dr. D. Hugo Cabedo Martí, director, y la Dra. Dña. Carmen Marín Díaz, codirectora de la tesis doctoral titulada **“DESCRIPCIÓN CLÍNICA Y GENÉTICA DE LOS PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE CHARCOT-MARIE-TOOTH EN EL ÁREA DE ALICANTE E IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS MUTACIONES EN CMT1”**.

**INFORMAN:**

Que Dña. Maria Empar Blanco Cantó ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado **“DESCRIPCIÓN CLÍNICA Y GENÉTICA DE LOS PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE CHARCOT-MARIE-TOOTH EN EL ÁREA DE ALICANTE E IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS MUTACIONES EN CMT1”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en ..... a ..... de ..... de 202....

Director de la tesis  
Dr. D. Hugo Cabedo Martí

Codirectora de la tesis  
Dra. Dña. Carmen Díaz Marín





Sant Joan d'Alacant, 2021

Dña. Elvira de la Peña García, Coordinadora del programa de Doctorado en Neurociencias del Instituto de Neurociencias de Alicante, centro mixto de la Universidad Miguel Hernández (UMH) y de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

**INFORMA:**

Que Dña. Maria Empar Blanco Cantó ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado "DESCRIPCIÓN CLÍNICA Y GENÉTICA DE LOS PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE CHARCOT-MARIE-TOOTH EN EL ÁREA DE ALICANTE E IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS MUTACIONES EN CMT1" conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en ..... a ..... de ..... de 202...

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

Dra. Elvira de la Peña García

Coordinadora del Programa de Doctorado en Neurociencias

E-mail : [elvirap@umh.es](mailto:elvirap@umh.es)  
[www.in.umh.es](http://www.in.umh.es)

Tel: +34 965 919533  
Fax: +34 965 919549

Av Ramón y Cajal s/n  
CAMPUS DE SANT JOAN  
03550 SANT JOAN D'ALACANT-  
ESPAÑA



*A mis padres*



## ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS .....	1
LISTADO DE FIGURAS .....	3
LISTADO DE TABLAS .....	4
RESUMEN .....	5
I. INTRODUCCIÓN .....	9
1. CONTEXTO Y FINALIDAD .....	11
2. PERSPECTIVA HISTÓRICA .....	12
2.1. Historia de la descripción clínica .....	13
2.2. La evolución de la clasificación .....	15
2.3. Los primeros avances en genética molecular .....	18
3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS .....	21
3.1. Características clínicas generales .....	21
3.2. Patrón de herencia .....	22
3.3. Estudios neurofisiológicos y anatomopatológicos .....	23
3.4. Aproximación diagnóstica .....	24
3.5. Características clínicas y correlación genética de los diferentes subtipos .....	25
3.5.1. Charcot-Marie-Tooth tipo 1 o desmielinizante .....	25
• CMT 1 Autosómico dominante .....	25
• CMT 1 Autosómico recesivo o CMT4 .....	28
3.5.2. Neuropatía Hereditaria con hipersensibilidad a la presión .....	29
3.5.3. Charcot-Marie-Tooth tipo 2 o axonal .....	30
3.5.4. Charcot- Marie-Tooth de tipo intermedio .....	32
• CMT ligado al X o CMTX .....	33
4. EPIDEMIOLOGÍA .....	37
5. LA ERA DE LA GENÉTICA .....	37
5.1. Paneles genéticos .....	38
5.2. <i>Whole-exome sequencing</i> .....	39
5.3. <i>Whole-genome sequencing</i> .....	40
5.4. Interpretación de los resultados .....	41

5.5. Limitaciones de las técnicas de <i>next generation sequencing</i> .....	42
6. TRATAMIENTO .....	43
6.1. Tratamiento rehabilitador .....	43
6.2. Tratamiento quirúrgico .....	45
6.3. Terapia molecular .....	46
6.3.1. Estudios realizados en CMT1A .....	46
• Ensayos clínicos realizados en humanos .....	47
• Ensayos preclínicos en modelos animales .....	48
II. OBJETIVOS .....	51
1. OBJETIVOS PRIMARIOS .....	53
2. OBJETIVOS SECUNDARIOS .....	53
III. MATERIAL Y MÉTODOS .....	55
1. DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO .....	57
2. IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE PACIENTES .....	58
3. RECOGIDA DE DATOS .....	59
3.1. Estudios neurofisiológicos .....	60
3.2. Patrón de herencia .....	60
3.3. Estudios genéticos .....	61
4. DESCRIPCIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LA MUESTRA .....	63
5. DESCRIPCIÓN CLÍNICO-GENÉTICA DEL GRUPO CMT1 AUTOSÓMICO DOMINANTE Y CASOS ESPORÁDICOS .....	64
5.1. Descripción detallada del tipo Charcot-Marie-Tooth tipo 1A .....	64
5.2. Análisis de los datos clínico-genéticos del resto de pacientes del grupo CMT1 AD y CMT1 casos esporádicos .....	68
5.3. Identificación de nuevas mutaciones .....	69
6. LIMITACIONES .....	69
7. ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES .....	70
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	71
IV. RESULTADOS .....	73
1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA .....	75
2. CÁLCULO DE LA PREVALENCIA .....	76
3. DESCRIPCIÓN GENÉTICA GLOBAL .....	77

4.	DESCRIPCIÓN GENÉTICA POR SUBGRUPOS .....	78
4.1.	Charcot-Marie-Tooth tipo 1 o desmielinizante .....	79
	• CMT1 Autosómico Dominante .....	79
	• CMT1 Autosómico Recesivo o CMT4 .....	81
	• CMT1 caso único o esporádico .....	82
4.2.	Charcot-Marie-Tooth tipo 2 o axonal .....	83
	• CMT2 Autosómico Dominante .....	83
	• CMT2 Autosómico Recesivo .....	84
	• CMT2 caso único o esporádico .....	84
4.3.	Charcot-Marie-Tooth con velocidades intermedias .....	86
	• CMTI caso único o esporádico .....	86
	• CMT ligado al X .....	87
4.4.	Neuropatía Hereditaria con hipersensibilidad a la presión .....	87
4.5.	Grupo de pacientes con EMG normal .....	87
4.6.	Grupo de pacientes con EMG no realizado .....	88
4.7.	Otros diagnósticos .....	88
4.8.	Casos perdidos .....	88
5.	DESCRIPCIÓN CLÍNICO GENÉTICA DEL GRUPO CMT1 AUTOSÓMICO DOMINANTE Y CASOS ESPORÁDICOS .....	89
5.1.	Charcot-Marie-Tooth tipo 1A (duplicación del gen PMP22) .....	89
	5.1.1. Variables generales .....	95
	5.1.2. Variables clínicas .....	96
	5.1.3. Variables neurofisiológicas y genéticas .....	98
	5.1.4. Casos perdidos .....	101
5.2.	Charcot- Marie-Tooth tipo 1B (mutación del gen MPZ) .....	101
5.3.	Charcot-Marie-Tooth tipo 1A por mutación puntual en PMP22 .....	102
5.4.	Familia CMT1 AD-1: mutación novel en EGR2 (P397H) asociada al polimorfismo LITAF (T49M) .....	104
5.5.	Familia CMT1 AD-2: variantes de significado incierto .....	108
5.6.	Familia CMT1 AD-3: estudio genético negativo .....	109
V.	DISCUSIÓN .....	113
1.	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA .....	115

1.1. Frecuencia relativa .....	115
1.2. Éxito diagnóstico .....	118
2. PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD DE CHARCOT-MARIE-TOOTH EN EL DEPARTAMENTO DE SALUD 19 .....	121
3. DESCRIPCIÓN GENÉTICA GLOBAL .....	123
4. DESCRIPCIÓN GENÉTICA POR SUBGRUPOS .....	126
4.1. Charcot-Marie-Tooth tipo 1 o desmielinizante .....	126
• CMT1 Autosómico Dominante .....	126
• CMT1 Autosómico Recesivo o CMT4 .....	127
• CMT1 caso único o esporádico .....	128
4.2. Charcot-Marie-Tooth tipo 2 o axonal .....	129
• CMT2 Autosómico Dominante .....	129
• CMT2 Autosómico Recesivo y caso único o esporádico .....	131
4.3. Charcot-Marie-Tooth intermedio .....	134
• CMT1 caso único o esporádico .....	134
• CMT ligado al X .....	135
4.4. Neuropatía Hereditaria con Hipersensibilidad a la presión .....	136
4.5. Grupo de pacientes con EMG normal o no realizado .....	136
4.6. Otros diagnósticos .....	137
5. DESCRIPCIÓN CLÍNICO-GENÉTICA DEL GRUPO CMT1 AUTOSÓMICO DOMINANTE Y CASOS ESPORÁDICOS .....	138
5.1. Charcot-Marie-Tooth tipo 1A (duplicación del gen PMP22) .....	138
5.1.1. Variables generales .....	138
5.1.2. Variables clínicas .....	139
5.1.3. Variables neurofisiológicas y genéticas .....	142
5.2. Charcot-Marie-Tooth tipo 1B (mutación del gen MPZ) .....	143
5.3. Charcot-Marie-Tooth tipo 1A por mutación puntual en PMP22 .....	144
5.4. Familia CMT1 AD-1: mutación novel en EGR2 (P397H) asociada al polimorfismo LITAF (T49M) .....	145
5.5. Familia CMT1 AD-2: variantes de significado incierto .....	147
5.6. Familia CMT1 AD-3: estudio genético negativo .....	148
VI. CONCLUSIONES .....	151

VII. BIBLIOGRAFÍA .....	157
ANEXO .....	181
AGRADECIMIENTOS .....	203



## ABREVIATURAS

**AD:** Autosómico dominante

**AGCL:** Ácidos grasos de cadena larga

**AR:** Autosómico recesivo

**ASOs:** Oligonucleótidos antisentido

**ChIP:** *Chromatin immunoprecipitation assays*

**CIBERER:** Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras

**CIDP:** Polineuropatía desmielinizante idiopática crónica (*Chronic demyelinating inflammatory polyneuropathy*)

**CINBERNED:** Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas

**CMAP:** Componente del potencial de acción del nervio motor (*compound muscle action potential*)

**CMT:** Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

**CNV:** Variación en el número de copias (*copy number variant*)

**DFSH:** Distrofia fascioescapulohumeral

**EMG:** Electromiograma

**HMN:** Neuropatía hereditaria motora (*Hereditary motor neuropathy*)

**HMSN:** Neuropatía hereditaria sensitivo-motora (*Hereditary motor-sensory neuropathy*)

**HNPP:** Neuropatía hereditaria con hipersensibilidad a la presión (*Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies*)

**HSAN:** Neuropatía hereditaria sensitiva y autonómica (*Hereditary sensory and autonomic neuropathy*)

**MLPA:** *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

**MMII:** Miembros inferiores

**MMSS:** Miembros superiores

**MNCV:** Velocidad de conducción del nervio motor (*motor nerve conduction velocity*)

**MPZ:** Proteína de la mielina cero (*Myelin protein zero*)

**MRC:** Escala de fuerza muscular modificada del *Medical Research Council*

**NCH:** Neuropatía congénita hipomielinizante

**NCV:** Velocidad de conducción del nervio (*nerve conduction velocity*)

**NGS:** *Next Generation Sequencing*

**NRG1:** Neuregulina-1

**NT-3:** Factor de crecimiento neurotrofina-3

**PMP22:** Proteína de la mielina periférica 22 (*Peripheral myelin protein 22*)

**PNP:** Polineuropatía

**SAOS:** Síndrome de la apnea obstructiva del sueño

**SDS:** Síndrome de Déjerine-Sottas

**SNAP:** Potencial de acción del nervio sensitivo (*sensory nerve action potential*)

**SNVs:** Variante de nucleótido único (*single nucleotide variants*)

**SPI:** Síndrome de piernas inquietas

**SVs:** *Structural variation*

**TTR:** Gen de la transtirretina

**WES:** *Whole-exome sequencing*

**WGS:** *Whole-genome sequencing*

## LISTADO DE FIGURAS

- **Figura 1.** Jean Martin Charcot, Pierre Marie y Howard Henry Tooth.
- **Figura 2.** Esquema de la evolución histórica de la descripción e identificación de genes en CMT y neuropatías hereditarias relacionadas.
- **Figura 3.** Imágenes de pacientes con diagnóstico de enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.
- **Figura 4.** Algoritmo diagnóstico para los pacientes con diagnóstico de CMT.
- **Figura 5.** Anatomía patológica del nervio sural en paciente con CMT1A.
- **Figura 6.** Dispositivos ortopédicos.
- **Figura 7.** Corrección de pie cavo mediante osteotomía de Inhäuser en paciente con CMT1.
- **Figura 8.** Fases del estudio.
- **Figura 9.** Origen y flujo de pacientes.
- **Figura 10.** Genes testados en cada grupo fenotípico de CMT.
- **Figura 11.** Caracterización genética de los diferentes subtipos de CMT analizados durante el período de enero 2015 a junio 2018.
- **Figura 12.** Gráficos de los árboles genealógicos de las familias CMT1A incluidas en el estudio.
- **Figura 13.** Árbol genealógico de la familia CMT1B.
- **Figura 14.** Árbol genealógico de la familia CMT1 por mutación puntual en PMP22.
- **Figura 15.** Árbol genealógico de la familia CMT1 AD-1.
- **Figura 16.** Árbol genealógico de la familia CMT1 AD-2.
- **Figura 17.** Árbol genealógico de la familia CMT1 AD-3.
- **Figura 18.** Mapa de prevalencia de los estudios epidemiológicos.

## LISTADO DE TABLAS

- **Tabla 1.** Clasificación de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.
- **Tabla 2.** Variables epidemiológicas del grupo de pacientes con neuropatías genéticas seleccionadas para el estudio.
- **Tabla 3.** Variables de características clínicas de CMT1A seleccionadas para el estudio.
- **Tabla 4.** Clasificación general en función de los datos electrofisiológicos y el patrón de herencia, así como porcentaje de diagnóstico genético confirmado.
- **Tabla 5.** Distribución genética de los pacientes.
- **Tabla 6.** Mutaciones y nuevas variantes de significado incierto identificadas en el grupo CMT1 AD.
- **Tabla 7.** Mutaciones y nuevas variantes de significado incierto identificadas en el grupo CMT1 AR.
- **Tabla 8.** Mutaciones identificadas en el grupo CMT1 caso único o esporádico.
- **Tabla 9.** Mutaciones y nuevas variantes de significado incierto identificadas en el grupo CMT2 AD.
- **Tabla 10.** Variantes de significado incierto identificada en el grupo CMT2 AR.
- **Tabla 11.** Mutaciones y nuevas variantes de significado incierto identificadas en el grupo CMT2 caso único o esporádico.
- **Tabla 12.** Descripción de los casos índice de las familias estudiadas.
- **Tabla 13.** Pruebas de normalidad de las variables cuantitativas en función de las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Saphiro Wilk.
- **Tabla 14.** Resultados descriptivos de las variables generales del grupo CMT1A.
- **Tabla 15.** Resultados descriptivos de las variables clínicas, neurofisiológicas y genéticas del grupo CMT1A.
- **Tabla 16.** Comparativa de estudios epidemiológicos en Charcot-Marie-Tooth.
- **Tabla 17.** Distribución genética y comparación con otras series.

## RESUMEN

**Introducción y objetivos.** La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth es la polineuropatía genética más frecuente. Se caracteriza por una amplia variedad fenotípica y genética influenciada por las peculiaridades sociodemográficas de cada territorio. Las nuevas técnicas de secuenciación masiva nos han permitido optimizar y ampliar las posibilidades de diagnóstico genético. El objetivo de este estudio es identificar a todos los pacientes con diagnóstico de neuropatía genética de nuestra área de salud con el fin de conocer la prevalencia de CMT y describir las características clínico-genéticas de los principales subgrupos de CMT con especial atención al grupo CMT1.

**Métodos.** La primera parte del estudio es observacional y descriptiva. En ella se expone la prevalencia de la enfermedad a fecha de junio de 2018, así como una descripción epidemiológica global y por subgrupos, especialmente el subtipo CMT1 AD y CMT1 casos esporádicos. La segunda parte del estudio es de tipo descriptivo y experimental. Está basado en la descripción de las nuevas mutaciones encontradas en el subgrupo CMT1 AD y CMT1 casos esporádicos, y en el desarrollo de los estudios llevados a cabo para la confirmación de su patogenicidad. La recogida de la información clínica de los pacientes se llevó a cabo mediante la historia informática. Se amplió el estudio genético en los pacientes candidatos mediante paneles genéticos seleccionados en cada caso en función de sus características fenotípicas. En colaboración con el Instituto de Neurociencias se completaron los estudios experimentales de las variantes encontradas.

**Resultados.** Se incluyeron un total de 131 pacientes, correspondientes a 71 familias. El 26.8% de los casos fue clasificado como CMT1, con una mayor frecuencia de herencia AD; el 25.4% como CMT2, con predominio de casos esporádicos; el 7.04% como CMTI, sobre todo relacionado con herencia ligada al X (CMTX); otro 7.04% de los casos se correspondían con HNPP; el resto (33.8%) fueron descartados por varios motivos (EMG normal, no realizado u otros diagnósticos). La prevalencia de CMT de nuestra área

de salud es de 31.8 casos por 100000 habitantes. La mutación más frecuente fue la duplicación de PMP22 (47.6%), seguida de las mutaciones en GJB1 (19.0%) y SH3TC2 (9.52%). En el subtipo CMT1 AD el grupo más frecuente fue CMT1A. Se identificó a una familia en heterocigosis compuesta por dos mutaciones en los genes EGR2 y LITAF. En otras dos familias se identificaron variantes de significado incierto. En el subtipo CMT1 AR se diagnosticaron dos familias con genética correspondiente a CMT4C. Entre los casos esporádicos se incluyó un paciente CMT1A, otro con una mutación novel en PMP22 (CMT1A *point mut*), y otro CMT1B por mutación en el gen MPZ. En el subtipo CMT2 solo se diagnosticó a un paciente por una mutación en el gen GADP1 (CMT2K). En el subgrupo con velocidades intermedias (CMTI) predominaron las mutaciones en el gen GJB1 (CMTX), identificándose también a un paciente con una mutación novel en el gen NEFL (CMTIG).

El 90% de los casos con diagnóstico de CMT1A presentaban una herencia AD, solo un caso era esporádico. En todos ellos se describió el fenotipo clínico y neurofisiológico característico de esta enfermedad, con deambulación preservada en el 70% de los casos.

**Discusión.** La distribución de los subgrupos CMT1 y CMT2 fue similar, incluyendo el grupo CMTI, que representó el 11.9% de los casos CMT. La prevalencia es de 31.8 casos por 100000, similar a la descrita en otros estudios epidemiológicos de nuestro país. Las mutaciones más frecuentes fueron en los genes PMP22, GJB1 y SH3TC2, en concordancia con las características demográficas de nuestra área geográfica. Las pacientes con diagnóstico de CMT1A presentaron las características clínicas típicas, manteniendo una funcionalidad aceptable la mayoría de ellos. Las mutaciones encontradas en MPZ y PMP22 se correlacionaron correctamente con la clínica presente en los pacientes y la descrita en la literatura actual. Los estudios de segregación familiar y experimentales realizados en la familia portadora de la mutación en EGR2 y LITAF permitieron demostrar la patogenicidad de ambas variantes en situación de heterocigosis compuesta por un efecto pernicioso sumatorio de ambas. El uso de paneles genéticos nos permitió estudiar de forma simultánea múltiples genes relacionados con CMT en familias seleccionadas reduciendo

así tiempo y recursos. La identificación de variantes de significado incierto y su interpretación supone un nuevo reto en estos casos en los cuales la colaboración entre la clínica y la investigación básica toma un papel fundamental.



# INTRODUCCIÓN



## I. INTRODUCCIÓN

### 1. CONTEXTO Y FINALIDAD

Cuando hablamos de neuropatía nos referimos a todos aquellos fenómenos que producen una alteración a nivel del nervio periférico, tanto en su componente axonal como en la vaina de mielina. Estos procesos pueden ser de diferente naturaleza y corresponder a etiologías diversas. Dentro de las causas más habituales se encuentra la diabetes, atrapamientos, enfermedades inflamatorias y autoinmunes, isquemia, procesos paraneoplásicos, deficiencias nutricionales, tóxicos, infecciones y alteraciones genéticas.

Las neuropatías genéticas o hereditarias se corresponden con un grupo heterogéneo de enfermedades que normalmente comparten una serie de características clínicas, así como un inicio insidioso y lento desarrollo. Actualmente se dividen entre aquellas en las que la neuropatía es la única manifestación de la enfermedad y aquellas en las que la neuropatía forma parte de una afectación multisistémica como, por ejemplo, la Ataxia de Friederich. En el primer grupo se incluyen la Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), la Neuropatía Hereditaria con Hipersensibilidad a la Presión (HNPP, del inglés *Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies*), las Neuropatías Hereditarias Motoras (HMN, del inglés *Hereditary motor neuropathy*) y las Neuropatías Hereditarias Sensitivas y Autonómicas, normalmente llamadas Neuropatías Hereditarias Sensitivas (HSAN, del inglés *Hereditary sensory and autonomic neuropathy*). Estas dos últimas realmente se corresponderían con los extremos del espectro de esta patología.

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth centra nuestra atención en este estudio. Se corresponde con la neuropatía hereditaria más frecuente. Sin embargo, en nuestra área de salud carecíamos de datos completos con respecto a su distribución clínico-genética y su prevalencia. Además, en algunos pacientes, los estudios genéticos eran incompletos o negativos. Esto podía llegar a suponer un problema para el

clínico y las familias, ya que no disponer de diagnóstico definitivo obliga en muchos casos a repetir pruebas complementarias innecesarias e impide realizar un adecuado consejo genético.

Por ello, el principal objetivo del estudio fue recoger todos los casos con sospecha de neuropatía genética de nuestra área de salud con el fin de llevar a cabo su correcta clasificación, optimizar los estudios genéticos realizados en cada uno de ellos e identificar aquellos con etiología genética no filiada para su estudio detallado con nuevas técnicas de diagnóstico. Decidimos centrarnos en el grupo con patrón desmielinizante y herencia autosómico dominante, al ser el más frecuente y en el que las posibilidades de éxito diagnóstico suelen ser mayores.

Este ámbito de estudio nos permitió aunar el interés tanto en la clínica como en la investigación básica y genética, dando lugar a un marco perfecto de colaboración entre ambos campos.

## **2. PERSPECTIVA HISTÓRICA**

A lo largo de la historia, la descripción de las enfermedades neurológicas, y en concreto de las que afectan al sistema neuromuscular, ha ido cambiando y se han ido desarrollando una serie de conceptos clínicos a medida que se iba profundizando en su conocimiento.

La denominación de las que conocemos actualmente como neuropatías hereditarias ha ido evolucionando desde el término “atrofia muscular progresiva” hasta la “atrofia muscular peroneal”, y se han desarrollado concomitantemente otros conceptos como la neuropatía hipertrófica o síndrome de Déjerine-Sottas, síndrome de Roussy-Lévy, síndrome de Davidenkow y neuropatía hipomielinizante congénita.

## 2.1 Historia de la descripción clínica

El término de atrofia muscular progresiva era el usado durante el siglo XIX para describir una serie de enfermedades que se manifestaban con debilidad y atrofia progresiva sin afectación sensitiva. La primera descripción de un caso de **atrofia muscular progresiva** que pudiera corresponderse con un caso de neuropatía hereditaria sensitivo-motora fue realizada por Virchow en 1855 (Virchow, 1855). Se trataba de un paciente con una debilidad y atrofia musculares progresivas de inicio en miembros inferiores que progresó hasta miembros superiores hasta finalmente alcanzar la parálisis completa.

El **síndrome de atrofia muscular peroneal**, o lo que conocemos actualmente como enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, fue descrito por primera vez en 1886. En febrero de ese año, en París, los neurólogos Jean Martin Charcot y Pierre Marie publicaron un artículo donde describían 5 casos de pacientes de entre 7 y 25 años de edad que presentaban lo que denominaron “Una forma particular del síndrome de atrofia muscular progresiva” (Charcot & Marie, 1886). En estos pacientes, 3 hombres y 2 mujeres, el inicio de la enfermedad se había producido entre los 3 y los 15 años, 3 casos eran esporádicos y 2 eran hermanos. La clínica se caracterizaba por una debilidad de inicio en miembros inferiores, sobre todo a nivel de la extensión del dedo gordo del pie y de los peroneos laterales, con afectación progresiva posterior de los músculos propios de las manos y pie caído bilateral con marcha en estepaje. Se asociaba también a deformidades (pies cavos, dedos en martillo y manos en garra), retracción del tendón de Aquiles, hiporreflexia y una escasa afectación sensitiva. En el estudio anatomopatológico encontraron una desmielinización de los cordones posteriores y atrofia de la zona de Lissauer. A pesar de que los nervios no presentaban hipertrofia, sí observaron un aumento del tejido intersticial conectivo y una hipertrofia de las láminas de la vaina en las zonas atróficas del nervio. Al encontrar afectación en ambas estructuras no pudieron concluir con seguridad si se encontraban ante una mielopatía o una neuritis múltiple periférica.

Unos 3 meses más tarde, Howard Henry Tooth presentó en la Universidad de Cambridge su tesis doctoral basada en 5 casos y titulada “El tipo peroneal de la atrofia muscular progresiva” (Tooth, 1886). Los pacientes contaban entre 7 y 49 años, con una edad de inicio de la enfermedad entre los 6 y los 35 años. Tres casos eran esporádicos, uno de ellos tenía un hermano mayor con síntomas similares y el restante compartía la afectación de las piernas con su madre. Destacó el inicio precoz en algunos pacientes y su posible característica hereditaria. En su trabajo definía como primera manifestación la atrofia muscular progresiva de inicio en miembros inferiores, más frecuentemente a nivel de los músculos peroneales, aunque también en el tibial anterior, extensor largo de los dedos y gemelos. Esta distribución topográfica llevó a Tooth a atribuir los síntomas a una neuropatía y no a una mielopatía, como se sugería en el manuscrito en Charcot y Marie, siendo así el primero en localizar correctamente la disfunción.

La descripción detallada de la enfermedad por parte de estos tres neurólogos (Figura 1) fue la que fundó las bases fisiopatológicas y genéticas de las neuropatías hereditarias y a ellos se debe su nombre.

### Figura 1

*Jean Martin Charcot, Pierre Marie y Howard Henry Tooth.*



Unos años después, Dejerine y Sottas (1893) publicaron el caso de dos hermanos con neuropatía periférica, con una clínica precoz muy grave y engrosamiento de los nervios con formaciones de mielina en “bulbo de cebolla”, denominándolo **neuropatía hipertrófica intersticial**. Sin embargo, este concepto

quedaría posteriormente descartado al demostrarse que los bulbos de cebolla provienen de las células de Schwann y que son una consecuencia no específica de una neuropatía desmielinizante, pudiendo aparecer en una gran variedad de patologías tanto genéticas como adquiridas (Austin, 1956; Thomas *et al.*, 1975).

El cuadro conocido durante años como **Síndrome de Roussy-Levy** fue descrito por estos dos neurólogos en 1926 (Roussy & Levy, 1926). En su artículo describieron las características clínicas de 7 miembros de una familia con una clínica similar, aunque en lugar de la atrofia muscular, destacaba fundamentalmente el temblor estático. Posteriormente quedaría confirmado por Dick y Lambert que estos pacientes no presentaban ninguna diferencia electrofisiológica, patológica o genética con respecto a la Neuropatía hereditaria sensitivo-motora tipo 1 (HMSN, del inglés *Hereditary motor sensory neuropathy*) (Dyck & Lambert, 1968a), descartándose como una entidad aparte.

En los años siguientes se publicaron otros artículos donde se describían pacientes con fenotipos intermedios como, por ejemplo, el **síndrome de Dawidenkow**, o formas graves como la **neuropatía hipomielinizante congénita**.

De esta forma los autores clásicos fueron describiendo magistralmente casos e intentando buscar correlaciones entre ellos. La clasificación nunca fue fácil debido a la gran heterogeneidad clínica y las particularidades de cada familia afectada.

## 2.2 La evolución de la clasificación

El primer intento de clasificar las atrofas musculares neurógenas por sus características clínicas y genéticas lo llevó a cabo Dawidenkow en 1927 (Dawidenkow, 1927). Sin embargo, su clasificación no se extendió nunca a la clínica habitual.

A mediados del siglo XX, el empleo de las técnicas electrofisiológicas para el estudio de las velocidades de conducción nerviosa ayudó a desarrollar la clasificación de las neuropatías hereditarias tal y como la conocemos actualmente. Los estudios de Lambert (1956) y posteriormente de Gilliat y Thomas (1957) describieron una disminución de la velocidad de conducción nerviosa en algunas familias afectas de neuropatías hereditarias crónicas y no en otras, en las cuales las velocidades eran prácticamente normales. Posteriormente, Dyck y sus colaboradores (1963), corroboraron estos hallazgos y crearon una clasificación de pacientes con enfermedad de CMT basándose en el modo de herencia, historia natural, características bioquímicas, velocidades de conducción nerviosa y hallazgos histopatológicos.

De esta forma se describieron dos grandes grupos: la forma hipertrófica y la forma neuronal. El primero de ellos incluía a los pacientes con velocidades de conducción disminuida y neuropatía hipertrófica hereditaria (Dyck & Lambert, 1968a). El segundo grupo incluía a aquellos pacientes con velocidades de conducción normales o ligeramente disminuidas y sin evidencia de desmielinización o hipertrofia del nervio en la biopsia (Dyck & Lambert, 1968b). En este segundo grupo se incluyeron casos de atrofia espinal muscular progresiva, ataxia de Friederich y paraparesia espástica con atrofia peroneal, que actualmente no están incluidos en la clasificación de CMT.

En los años posteriores, se estableció el concepto de Neuropatía hereditaria sensitivo motora (HMSN) tipo I y tipo II (Harding & Thomas, 1980b). En 1975, el propio Dick reclasificó las neuropatías hereditarias (Dyck & Thomas, 1975). El síndrome de Roussy-Levy ya había sido considerado como una variante clínica de HMSN tipo I, por lo que no se incluyó como grupo independiente. El resto de las formas fueron clasificadas de la siguiente manera:

- HMSN tipo I (forma dominante hipertrófica con velocidades de conducción disminuidas).
- HMSN tipo II (forma neuronal con velocidades de conducción normales o ligeramente disminuidas).

- HMSN tipo III (forma hipertrófica de la infancia grave y precoz, recesiva o esporádica, correspondiente con el síndrome de Déjerine-Sottas).
- HMSN tipo IV (Enfermedad de Refsum).
- HMNS tipo V (atrofia peroneal asociada a paraplejía espástica hereditaria).
- HMNS tipo VI (atrofia peroneal asociada a atrofia óptica).
- HMNS tipo VII (atrofia peroneal asociada a retinitis pigmentosa).

Este es uno de los primeros esquemas que más se asemeja a la clasificación actual. Posteriormente se llevó a cabo una reorganización por Harding (1988), en el que ya se incluyeron los primeros descubrimientos en genética, los grupos del IV al VI se eliminaban y se añadía una forma ligada al X y otro grupo de formas complejas. Actualmente la forma III o síndrome de Dejerine-Sottas ha quedado relegado a un concepto histórico al relacionarse este perfil fenotípico con múltiples mutaciones en diferentes genes (Planté-Bordeneuve *et al.*, 2001) tales como PMP22 (Roa *et al.*, 1993), MPZ (Roa *et al.*, 1993) y EGR2 (Boerkoel *et al.*, 2001).

En la clasificación actual el término HMSN ha sido sustituido por CMT. Se reconocen cinco grandes grupos:

- Tipo CMT1 (forma desmielinizante autosómica dominante con velocidades de conducción motora del nervio <38m/s).
- Tipo CMT4 (forma desmielinizante autosómica recesiva con velocidades de conducción motora del nervio <38m/s).
- Tipo CMT2 (formas axonales autosómico dominante y recesiva con velocidades de conducción motora del nervio >38 m/s).
- Tipo CMTI (formas intermedias autosómico dominante y recesiva con velocidades de conducción motora del nervio entre 25-45m/s).

- Tipo CMTX (forma ligada al X. Se incluye en algunas clasificaciones en el tipo CMTI al presentar velocidades de conducción en rango intermedio).

En la descripción de cada forma se asigna una letra a cada uno de los genes identificados. De esta manera la duplicación del gen PMP22 asociado al tipo desmielinizante autosómico dominante se corresponde con la letra A, y por ello este tipo se denomina CMT1A. Veremos a continuación cómo y porqué se han ido asociando las diferentes letras a cada uno de los genes y subtipos.

### 2.3 Primeros avances en genética molecular

Heimler *et al* (1978) determinaron el primer paso hacia la comprensión clínico-molecular al describir a una familia con diagnóstico de CMT que segregaba con el Síndrome del carcinoma de células basales nevoide correlacionado con el factor Rh sanguíneo en el cromosoma 1. Posteriormente, los trabajos de enlace genético realizados por Bird *et al* (1982) permitieron localizar el defecto genético en el cromosoma 1q en el locus Duffy (Fy). Estudios posteriores demostraron que no todas las familias afectas de CMT localizaban este mismo defecto genético, empezando a poner en evidencia la gran heterogeneidad genética de esta enfermedad (Bird *et al.*, 1983; Dyck *et al.*, 1983; Guiloff *et al.*, 1982). De hecho, el grupo de pacientes con patrón desmielinizante más numeroso no se correspondía con esta mutación, por lo que se decidió nombrar este subtipo como CMT1A y al grupo con la mutación definida en ese momento, como CMT1B (Bird, 1999; Dyck *et al.*, 1983). Unos años más tarde, se consiguió identificar la mutación de la forma CMT1A en el cromosoma 17p11.2 (Vance *et al.*, 1989). Finalmente, en 1991, Raeymaekers *et al* (1991) y Lupski *et al* (1991) describieron casi simultáneamente que la mutación se basaba en una duplicación parcial de esta región cromosómica. A su vez, fue localizado en Japón por Hayasaka *et al* (1993) el gen de la proteína P0 de la mielina humana (MPZ) en el cromosoma 1 cerca del locus Fy. Tras confirmar diferentes mutaciones de este gen en varias familias, finalmente se asignó el gen

MPZ a CMT1B (Hayasaka *et al.*, 1993). De esta forma quedaron definidas ambas formas de CMT1 en ese momento y se inició la descripción clínico-genética de la enfermedad tal y como lo conocemos actualmente.

La asignación del gen PMP22 a la duplicación se llevó a cabo gracias al modelo murino de CMT1A. El ratón con la mutación *Trembler* (Tr) se caracteriza por desarrollar una neuropatía hipomielinizante de herencia autosómico dominante (Falconer, 1951). El locus del gen Tr se localiza en el cromosoma 11, el cual presenta una gran homología con el cromosoma humano 17p incluyendo la región duplicada de CMT1A. Suter *et al* (1992), describieron que los ratones Tr tenían mutaciones en la proteína de la mielina periférica 22 (PMP22), que se expresa en las células de Schwann y se localiza en el cromosoma 11 murino. Esto sugería que, en los humanos, este mismo gen que se localiza en el cromosoma 17p11.2-12 podría ser responsable de CMT1A. Esta hipótesis fue confirmada posteriormente por otros investigadores (Matsunami *et al.*, 1992; Patel *et al.*, 1992), relacionando definitivamente el gen PMP22 con la forma CMT1A y sugiriendo que la duplicación de 1.4 millones de pares de bases (Mb) del cromosoma 17p11.2-12 incluía este gen, cuya sobreexpresión podría ser la causa de la neuropatía desmielinizante.

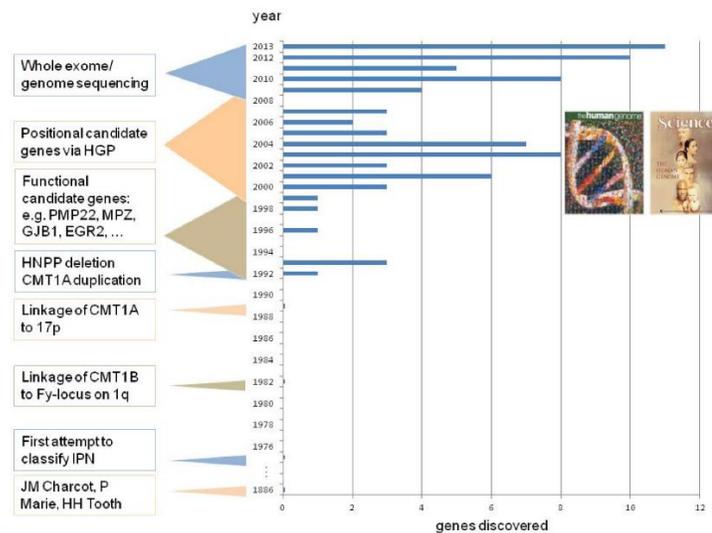
Posteriormente se fueron describiendo otros genes relacionados con la forma CMT1. En el caso de CMT1C se identificó su locus en el cromosoma 16p13.1-p12.3 asociado a mutaciones del gen LITAF/SIMPLE (Street *et al.*, 2002; Street *et al.*, 2003). En CMT1D se han encontrado mutaciones puntuales del gen EGR2 (Briani *et al.*, 2010; Warner *et al.*, 1998). En la forma CMT1E se comparte el mismo gen NEFL con la forma CMT2E en la que realmente fue descrito inicialmente (Mersiyanova *et al.*, 2000) y que en el caso de CMT1 da lugar a una forma muy grave y precoz (Jordanova *et al.*, 2003).

La forma CMT4 se corresponde con la forma desmielinizante con patrón de herencia autosómico recesivo. Recibió este nombre al ser descrita tras CMT1, CMT2 y la ya desaparecida forma CMT3. Othmane *et al* (1993) identificaron la mutación de la forma CMT4A en el cromosoma 8q-q21.1. Unos años más tarde

se identificaría el gen GDAP1 en esta región (Baxter *et al.*, 2002). Posteriormente se han ido descubriendo otros genes relacionados con este patrón como el gen SH3TC2 (Senderek *et al.*, 2003), que se clasificó como subtipo CMT4C.

**Figura 2**

*Esquema de la evolución histórica de la descripción e identificación de genes en CMT y neuropatías hereditarias relacionadas.*



NOTA: La figura muestra el número de genes que se han descrito a partir de la identificación de la duplicación de PMP22 en CMT1A. Cabe destacar el aumento significativo de genes descritos a partir del año 2009, cuando los estudios de secuenciación genética empezaron a ser más accesibles en investigación y práctica clínica habitual. Extraído de “*Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) Disease within the Frame of the Human Genome Project Success*” (Timmerman *et al.*, 2014).

De esta forma, a medida que se han ido descubriendo genes, cada uno de ellos ha sido relacionado con una letra que se añade al final del subtipo concreto. Actualmente hay descritos más de 80 genes relacionados con esta enfermedad (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTmutations/Mutations>). Además, un mismo fenotipo puede estar causado por diferentes mutaciones en un mismo gen y locus cromosómico (heterogeneidad alélica) o por mutaciones en otros genes en diferentes locus del cromosoma

(heterogeneidad de locus). Por lo que diferentes mutaciones de un mismo gen pueden estar denominadas por diferentes letras en función de si se asocia con un patrón desmielinizante o axonal. Esta gran heterogeneidad y el descubrimiento de nuevas interacciones entre los diferentes genes dan lugar a una necesidad de actualización constante y puede llegar a complicar mucho este tipo de clasificación. Por ello, recientemente se han propuesto nuevas formas en las que se proponen prefijos indicadores del patrón de herencia (AD, AR), la sustitución del número como indicador del fenotipo por sufijos como “de-“ para desmielinizante y “ax-“ para axonal, y de las letras por el gen identificado con el fin dar lugar a una mayor precisión descriptiva (Mathis *et al.*, 2015).

### 3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

#### 3.1 Características clínicas generales

La enfermedad de Charcot Marie Tooth presenta una serie de características clínicas comunes en todos los pacientes (Shy *et al.*, 2005). La sintomatología principal es una polineuropatía motora y sensitiva longitud dependiente crónica y progresiva. En la mayoría de los casos el inicio se produce en la infancia o adolescencia, aunque existen formas tardías de inicio en la edad adulta. El fenotipo clásico incluye un déficit sensitivo y motor distal con marcha en estepaje, amiotrofias distales dando lugar al signo de “piernas en botella invertida” o “manos en garra” y malformaciones óseas como pies cavos, dedos en martillo y escoliosis (Figura 3). Los reflejos están disminuidos y la afectación de la sensibilidad propioceptiva da lugar a una ataxia sensitiva. Algunos pacientes presentan dolor musculoesquelético y neuropático, siendo las parestesias poco frecuentes. Normalmente la afectación de miembros superiores es posterior en la evolución de la enfermedad.

En la consulta los pacientes suelen referir dificultades para caminar, esguinces de repetición, pies caídos, torpeza motora y dificultades para la manipulación fina. Otros síntomas frecuentes son temblor,

calambres, frialdad cutánea, acrocianosis y callosidades en los pies (Pareyson & Marchesi, 2009). Cada uno de los subtipos presenta una serie de características clínicas especiales que describiremos a continuación.

### Figura 3

*Imágenes de pacientes con diagnóstico de enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.*



NOTA: A. Amiotrofia distal en miembros inferiores con “piernas en botella invertida”. B. Deformidades distales con pies cavos. C. Amiotrofia marcada de músculos interóseos de las manos con “manos en garra”. Extraído de *“Diagnosis, natural history, and management of Charcot–Marie–Tooth disease”* (Pareyson & Marchesi, 2009).

### 3.2 Patrón de herencia

Una de las características que va a determinar si la enfermedad es genética o no es el tiempo de evolución y la presencia de familiares afectados. Esta enfermedad puede transmitirse siguiendo varios patrones de herencia:

- Autosómica dominante (AD), cuando existen dos o más individuos afectados en varias generaciones y/o transmisión varón-varón.
- Autosómica recesiva (AR), cuando no existen individuos afectados en alguna generación. Por ejemplo, dos hermanos afectados, pero con padres sanos o consanguíneos.
- Ligado al X, cuando la transmisión de la enfermedad se realiza de madres a hijos varones exclusivamente.
- Casos esporádicos, cuando no existen antecedentes familiares conocidos.

En las familias grandes y con muchos individuos afectados es relativamente sencillo determinar el patrón de herencia. Pero en caso contrario, individuos adoptados o en los casos esporádicos puede llegar a ser un reto. En estas situaciones se suele tener en cuenta el contexto social y la región geográfica en la que nos encontremos (Rossor *et al.*, 2015).

### 3.3 Estudios neurofisiológicos y anatomopatológicos

Como hemos descrito previamente, la clasificación actual se lleva a cabo siguiendo estos patrones de herencia y las velocidades de conducción nerviosa. Por ello, los estudios neurofisiológicos son los primeros que se han de realizar ante la sospecha de una polineuropatía genética. Cuando la velocidad de conducción motora del nervio (NCV, *nerve conduction velocity*) mediano o cubital es  $<38\text{m/s}$  se clasifica como desmielinizante y cuando es  $>38\text{m/s}$  se clasifica como axonal (Pareyson *et al.*, 2006; Reilly, 2007; Shy *et al.*, 2005). No obstante, existe una tercera forma intermedia en la que las velocidades de conducción se encuentran entre  $25\text{-}45\text{m/s}$  (Davis *et al.*, 1978; Reilly *et al.*, 2011), que describiremos en detalle más adelante. Este último patrón debe hacernos pensar, en caso de individuo varón, en un patrón de herencia ligado al X. Los estudios neurofisiológicos también nos van a permitir definir el grado de afectación motora o sensitiva.

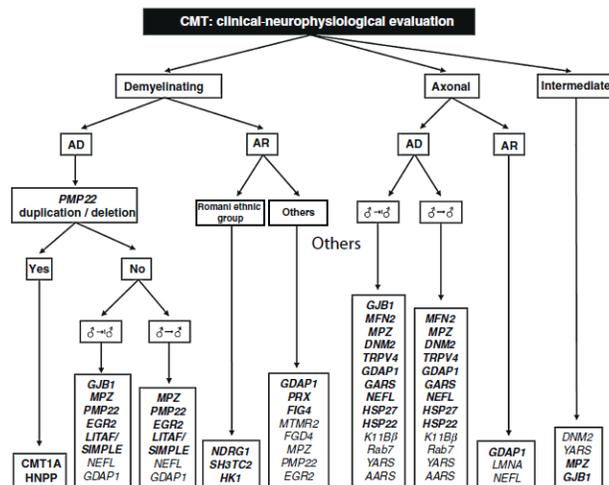
En esta enfermedad la biopsia ha dejado de tener un papel fundamental. No obstante, los hallazgos anatomopatológicos presentan una buena correlación con las características neurofisiológicas y pueden ser de interés en algunos casos con diagnóstico dudoso.

### 3.4 Aproximación diagnóstica

Basándonos en estos datos clínicos y neurofisiológicos se constituye la clasificación actual de CMT. Una vez ha quedado definido clínicamente el paciente, el siguiente paso es el diagnóstico genético. En cada una de las formas hay una serie de genes que son más frecuentes y serán los primeros en ser estudiados. El siguiente algoritmo (Figura 4) desarrollado por el grupo de enfermedades neuromusculares de la Sociedad Española de Neurología e investigadores del grupo CINBERNED (Berciano *et al.*, 2012) reúne los genes más habituales en cada subgrupo.

**Figura 4**

*Algoritmo diagnóstico para los pacientes con diagnóstico de CMT.*



NOTA: AD: autosómico dominante, AR: autosómico recesivo, ♂ → ♂ transmisión varón-varón, ♂ → | ♀ no evidencia de transmisión varón-varón. Extraído de “*Guidelines for molecular diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease*” (Berciano *et al.*, 2012).

### 3.5 Características clínicas y correlación genética de los diferentes subtipos

A pesar de que los pacientes presentan una relativa similitud entre ellos, existe una gran variabilidad fenotípica. Describimos a continuación las características clínicas y genéticas más representativas de los diferentes tipos de CMT.

#### 3.5.1 *Charcot-Marie-Tooth tipo 1 o desmielinizante*

- **CMT 1 Autosómico dominante**

La forma desmielinizante autosómica dominante o CMT1 es la más frecuente y se corresponde con el 55-60% de los casos de CMT (Murphy *et al.*, 2012; Saporta *et al.*, 2011). Actualmente hay descritas 5 formas de CMT1 de la A a la F, una forma *plus* y otra paucisintomática (Tazir *et al.*, 2014).

La forma **CMT1A** es la más frecuente y se debe a una duplicación de aproximadamente 1.5Mp en el cromosoma 17q11.1p-p12 en el cual se encuentra el gen PMP22 (Lupski *et al.*, 1991; Raeymaekers *et al.*, 1991).

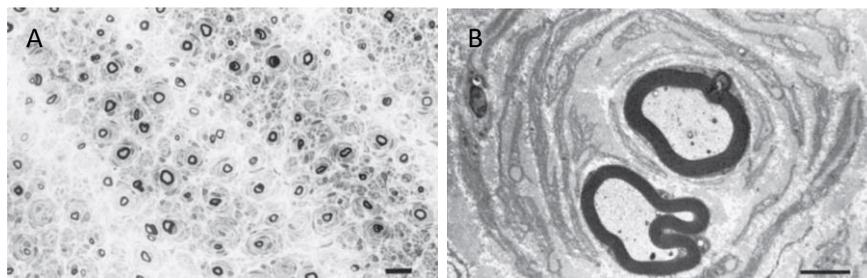
La gran mayoría de los pacientes presenta el fenotipo clásico de CMT (Thomas *et al.*, 1997). Se caracteriza por un inicio de la sintomatología entre la primera o segunda década de vida. La debilidad y amiotrofia de los músculos intrínsecos de pies y manos, y de los músculos peroneales y tibiales da lugar a torpeza y por lo tanto a caídas frecuentes, y en algunos casos determina un retraso en la adquisición de la marcha. Los reflejos osteotendinosos se encuentran disminuidos, abolidos en el caso de los aquíleos de forma característica. En la exploración observaremos malformaciones esqueléticas como pies cavos, dedos en martillo, cifosis o escoliosis y, en un 25% de los pacientes, una hipertrofia de los nervios periféricos. La pérdida de sensibilidad es longitud dependiente y puede afectar a todas las modalidades. Muchos pacientes refieren dolor neuropático debido a una disminución en la densidad y afectación de las

fibras finas mielínicas (A $\delta$ ) intraepidérmicas (Laurà *et al.*, 2014; Nolano *et al.*, 2015). En ocasiones es difícil de diferenciar del dolor musculoesquelético producido por las alteraciones de la biomecánica. En algunos pacientes se ha descrito temblor, problemas auditivos, síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS) o un Síndrome de piernas inquietas (SPI) asociado a CMT1 (Auer-Grumbach *et al.*, 1998; Boentert *et al.*, 2014; Colomban *et al.*, 2014). El grado de afectación es leve a moderado y la progresión de la enfermedad es lenta (Berciano *et al.*, 2010), por lo que la esperanza de vida no se ve afectada.

En todos los pacientes los estudios neurofisiológicos demuestran una disminución homogénea de las velocidades de conducción nerviosa motoras (MNCV) inferiores a 38m/s (Birouk *et al.*, 1997). Estas se empiezan a afectar durante los primeros 5 años de vida y posteriormente suelen variar poco (Yiu *et al.*, 2008). En algunos estudios se ha demostrado que realmente lo que se relaciona con el lento deterioro clínico que presentan estos pacientes a lo largo de su vida es el descenso progresivo de la amplitud de los potenciales de acción motora (CMAP, *compound muscle action potential*), indicador del daño axonal que se produce a la larga en las formas desmielinizantes (Krajewski *et al.*, 2000)(Shy *et al.*, 2008a).

### Figura 5

*Anatomía patológica del nervio sural en paciente con CMT1A.*



NOTA: A. Sección transversal semifina del nervio sural con tinción azul de Toulidina: se observan múltiples “bulbos de cebolla”. B. Microscopía electrónica: se observan dos pequeños axones mielinizados rodeados de proliferaciones de células de Schwann en forma de “bulbos de cebolla”. (Extraído de “*Neurology in clinical practice. 6th Edition*” (Katirji & Koontz, 2012).

En estos pacientes, los estudios hematológicos y bioquímicos son normales, así como el líquido cefalorraquídeo. Esto nos permite diferenciar estas entidades de otras que nos pueden llevar a confusión como algunas neuropatías adquiridas, la Polirradiculoneuropatía desmielinizante crónica (CIDP) o las miopatías distales. Aunque en algunos casos de deterioro rápidamente significativo se ha descrito la coexistencia de una neuropatía hereditaria con una inflamatoria (Ginsberg *et al.*, 2004). A nivel anatomopatológico (Figura 5) se observa en las biopsias de nervio sural una neuropatía hipertrófica con una disminución significativa de los axones mielinizados, áreas de desmielinización y remielinización, aumento del área endoneural y formación de “bulbos de cebolla” compuestos por tejido conectivo, varias capas de lámina basal y células de Schwann.

La forma CMT1A engloba también los pacientes que presentan mutaciones puntuales en el gen PMP22. Estas mutaciones son menos frecuentes (entre el 1-5% de los casos). Dan lugar a un espectro fenotípico que va desde las formas CMT1A graves de inicio precoz (anteriormente englobadas en el Síndrome de Déjerine-Sottas) hasta formas leves de Neuropatía por hipersensibilidad a la presión (Russo *et al.*, 2011; Koutsis *et al.*, 2012).

**CMT1B** es la segunda forma más frecuente de CMT1, que se corresponde con aproximadamente el 5% de los casos de CMT (Saporta *et al.*, 2011). Está causada por mutaciones en el gen que codifica la proteína cero de la mielina (PO; MPZ) localizado en el cromosoma 1q22-23 (Hayasaka *et al.*, 1993). Además del fenotipo clásico, estos pacientes presentan una serie de características específicas como pupilas de Argyll-Robertson, hipoacusia y temblor (Duan *et al.*, 2016; Murphy *et al.*, 2011).

Clínicamente, CMT1B muestra una expresión heterogénea con tres fenotipos mayores en función de la clínica y las características neurofisiológicas. Una primera forma infantil, de inicio habitualmente antes de los 5 años, con retraso en la adquisición de las habilidades motoras y una neuropatía desmielinizante grave con MNCV <15m/s. Una segunda forma juvenil, de inicio en entre los 6-20 años,

clínicamente superponible a CMT1A y con velocidades de conducción en rangos desmielinizantes-intermedios de 15-30m/s. Estos dos grupos normalmente presentan una afectación clínica mayor y son clasificados como CMT1B. Se corresponden con un cuarto de los casos cada uno de ellos. El tercer grupo, correspondiente a la forma adulta, incluye a los pacientes con un inicio de la clínica por encima de los 20 años, normalmente alrededor de la cuarta década, con un fenotipo menos grave y velocidades de conducción alrededor de los 44m/s, por lo que en muchas ocasiones son clasificados como CMT2I. Este último grupo engloba a la mitad de los casos y es en el que mayor número de nuevas mutaciones se están describiendo actualmente. Cada uno de estos fenotipos suele estar asociado a unas mutaciones en concreto, aunque se desconoce con exactitud los mecanismos fisiopatológicos inherentes a cada una de ellas (Callegari *et al.*, 2019; Sanmaneechai *et al.*, 2015; Shy *et al.*, 2004; Shy, 2006). El gen MPZ se expresa únicamente en las células de Schwann. Una probable hipótesis es que las mutaciones asociadas a los fenotipos infantil y juvenil den lugar a una alteración en los procesos de mielinización, mientras que las asociadas a las formas adultas conduzcan a una disfunción en las interacciones entre las células de Schwann y el axón o alteraciones estructurales de los nodos y paranodos (Eggers *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2012; Shy, 2006).

El resto de las formas desmielinizantes son menos frecuentes y están relacionadas con los genes LITAF (CMT1C), EGR2 (CMT1D), NEFL (CMT1F), FBLN5 (CMT1 plus) y ARHGEF10.

- **CMT1 Autosómico recesivo o CMT4**

Estas formas son menos habituales y se caracterizan por un curso clínico de inicio temprano y agresivo. Elementos epidemiológicos, geográficos, clínicos y patológicos nos sirven de guía a la hora de elegir los genes candidatos. Se han descrito mutaciones en múltiples genes, cada uno con una serie de características clínicas particulares.

La primera forma descrita fue **CMT4A**, relacionada con el gen de la proteína GDAP1 en el cromosoma 8q21. Clínicamente presenta las características típicas con un inicio precoz y una progresión rápida, con debilidad progresiva y malformaciones esqueléticas llegando a la incapacidad incluso en la adolescencia, disminución de las MNCV e hipomielinización significativa en la biopsia de nervio (Othmane *et al.*, 1993). Posteriormente se han descrito otras mutaciones en este gen asociadas a formas recesivas intermedias (RI-CMTA) (Nelis *et al.*, 2002; Senderek *et al.*, 2003) y axonales (AR-CMT2K) (Birouk *et al.*, 2003; Cuesta *et al.*, 2002), y a formas dominantes axonales (CMT2K) (Chung *et al.*, 2008; Claramunt *et al.*, 2005), lo cual dificulta en algunos casos su correcta clasificación.

La forma **CMT4C** podría considerarse como la más frecuente, no solo del tipo CMT desmielinizante recesivo, si no de todas las formas recesivas (DiVincenzo *et al.*, 2014; Murphy *et al.*, 2012). Se relaciona con mutaciones en el gen SH3TC2. Se han descrito mutaciones en este gen en múltiples regiones geográficas y asociadas a diferentes etnias (Gosselin *et al.*, 2008; Laššuthová *et al.*, 2011). En la cuenca Mediterránea, concretamente en España, suele relacionarse con familias de etnia gitana (Claramunt *et al.*, 2007; Sevilla *et al.*, 2013). Clínicamente se manifiesta de forma precoz y asocia escoliosis y alteraciones de los pares craneales tales como hipoacusia y disfunción de los oculomotores (Azzedine *et al.*, 2006; Piscosquito *et al.*, 2016).

Además de estas dos formas, se han descrito mutaciones en los genes MTMR2 (CMT4B, CMT4B1), SBF2 (CMT4B2), SBF1 (CMT4B3), NDRG1 (CMT4D), EGR2 y MPZ (CMT4E), PRX (CMT4F), cromosoma 10q23 (CMT4G), FGD4 (CMT4H), FIG4 (CMT4J) y SURF1 (CMT4K) asociadas a este fenotipo.

### **3.5.2 Neuropatía hereditaria con hipersensibilidad a la presión**

La neuropatía hereditaria con hipersensibilidad a la presión (HNPP) o neuropatía tomacular, está relacionada con la delección de la misma región de 1.5Mb del gen PMP22 que se encuentra duplicado en

CMT1A (Chance *et al.*, 1993). Se han descrito también algunas mutaciones puntuales en PMP22 que darían lugar a esta enfermedad (Karadima *et al.*, 2015; Nicholson *et al.*, 1994). Se caracteriza por un patrón de herencia autosómico dominante, aunque puede darse *de novo* en un 20% de los casos (Infante *et al.*, 2001; Rudnik-Schöneborn *et al.*, 2016). Presenta un inicio en torno a la segunda o tercera década de vida. Se distingue por episodios transitorios y recurrentes de síntomas motores y sensitivos no dolorosos en el territorio de un nervio o plexo aislado. Habitualmente se desencadenan tras una mínima presión del nervio afectado y los síntomas suelen durar días o incluso meses (Chance, 2006). En la mayoría de los pacientes (60-70%) se manifiestan solo como episodios de neuropatía única aguda y focal, aunque en algunos se describe también abolición de los reflejos y pies cavos. En un 10-15% de los casos puede quedar un leve déficit motor crónico, parestesias y calambres (Mouton *et al.*, 1999; Pareyson *et al.*, 1996), presentando unas características similares a un fenotipo CMT.

Normalmente el estudio neurofisiológico ofrece muchas pistas ya que podremos observar una neuropatía generalizada con retraso de las latencias motoras, disminución leve-moderada de los potenciales sensitivos y de las velocidades de conducción motora y sensitiva asociada a bloqueos de la conducción en puntos de compresión (Andersson *et al.*, 2000).

Dado que esta enfermedad no presenta el fenotipo clásico de CMT y lleva asociado un electromiograma característico en la mayoría de los pacientes, normalmente no se incluye como subtipo de CMT en los estudios o ensayos clínicos.

### **3.5.3 Charcot-Marie-Tooth tipo 2 o axonal**

Los casos de neuropatía axonal o CMT2 se corresponden con el 12-37% de todos los pacientes con CMT (Murphy *et al.*, 2012; Saporta *et al.*, 2011; Sivera *et al.*, 2013). Clínicamente son superponibles a los CMT1, aunque presentan una serie de características que permiten diferenciarlos. La edad de inicio

suele ser posterior y las malformaciones esqueléticas no son tan graves. Algunos estudios han descrito una mayor debilidad proximal y en manos, así como temblor (Bienfait *et al.*, 2007). Pueden llevar asociados síntomas atípicos como piramidalismo o atrofia del nervio óptico (Harding & Thomas, 1984; Vucic *et al.*, 2003). Los estudios neurofisiológicos demuestran MNCV > 38m/s con disminución de la amplitud de los potenciales de acción motora (CMAP) y sensitiva (SNAP). En los estudios de anatomía patológica se observa una degeneración axonal con grupos de regeneración, pero sin signos de desmielinización.

A pesar de la gran heterogeneidad genética, los pacientes presentan homogeneidad fenotípica dentro del mismo grupo, aunque con grados de afectación variable (Bienfait *et al.*, 2007).

El subtipo **CMT2A2** es la forma más frecuente de CMT2 y se corresponde con aproximadamente el 10-30% de los casos (Feely *et al.*, 2011; Verhoeven *et al.*, 2006). Se relaciona con una mutación de la proteína mitocondrial mitofusina 2 (MFN2) ligada al cromosoma 1p35 (Saito *et al.*, 1997). Presenta varios patrones de transmisión hereditaria. Suele ser una forma muy agresiva que limita a los pacientes a una silla de rueda ya en la segunda década de vida. En algunos casos se asocia con atrofia del nervio óptico, parálisis de las cuerdas vocales e hipoacusia, así como afectación del sistema nervioso central con atrofia de la médula espinal e hidrocefalia (Bombelli *et al.*, 2014).

El resto de las formas CMT2 son mucho menos frecuentes y se asocian con los genes KIF1B y MNF2 (CMT2A), RAB7 (CMT2B), TRPV4 (CMT2C), GARS (CMT2D), NEFL (CMT2E), HSPB1 (CMT2F), MPZ (CMT2I), GADP1 (CMT2K), HSPB8 (CMT2L) Y AARS (CMT2N).

### 3.5.4 *Charcot-Marie-Tooth de tipo intermedio*

El tipo intermedio de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth es un síndrome complejo, dadas las diferentes formas de patrón de herencia al cual se asocia y las controversias acerca de sus características neurofisiológicas. Abarca el 3-15.6% de todos los casos de CMT, en función de las series (Braathen et al., 2010)(Murphy et al., 2012).

Este fenotipo fue descrito inicialmente por Davis *et al* en 1978 como un grupo con MNCV del nervio mediano entre 25-45m/s, CMAP conservado, ausencia de hipertrofia del nervio en la biopsia y un fenotipo de características similar al clásico, pero con una progresión clínica más rápida (Davis *et al.*, 1978). De esta forma se clasificaban pacientes que no presentaban características claras correspondientes a los dos grandes grupos. Sin embargo, en la práctica clínica diaria, este amplio rango de velocidades de conducción puede llevar a confusión a la hora de clasificar los pacientes. Además, hemos de tener en cuenta que en las polineuropatías axonales puede producirse, junto con un descenso importante de la amplitud del potencial de acción, una disminución de las MNCV en rango intermedio e incluso desmielinizante. Esto se produce como consecuencia de una desmielinización secundaria, la pérdida de las fibras largas de conducción nerviosa y los procesos de regeneración axonal (Mahmoud Ali Hewedi *et al.*, 2019; Nicholson & Myers, 2006). De esta forma, se pueden interpretar como rango intermedio pacientes que realmente tienen patología axonal. Teniendo en cuenta estos factores, publicaciones recientes han propuesto el registro de la CMAP y las MNCV tanto distales como proximales del nervio mediano, con el fin de llevar a cabo un estudio más preciso de las velocidades reales de conducción motora y una clasificación correcta de los pacientes (Berciano *et al.*, 2017). Aquellos pacientes con velocidades intermedias, pero CMAP normales o por encima del 50% del límite normal tanto a nivel distal como en su registro proximal (incluyendo la axila), se clasificarían como CMT intermedio y aquellos con CMAP disminuido como CMT axonal.

CMTI se asocia con el patrón de herencia ligado al X (**CMT ligado al X**, mayoritariamente causado por mutaciones en el gen GJB1), así como con mutaciones en genes con herencia tanto autosómica dominante (**DI-CMT**: genes DNM2, YARS, MPZ, INF2, GNB4, NEFL, MNF2, AARS y DCTN2) como recesiva (**RI-CMT**: genes GDAP1, KARS, PLEKHG5 y COX6A1). Cada uno de los genes presenta una serie de características clínicas que nos puede orientar hacia su diagnóstico (Berciano *et al.*, 2017; Liu & Zhang, 2014).

- **CMT ligado al X o CMTX**

El grupo CMTX se corresponde con aproximadamente el 7-10% de todos los CMT (Fridman *et al.*, 2015). Se clasifica en 5 tipos, siendo **CMTX1** el fenotipo más frecuente, con prácticamente el 90% de los casos. Se debe a mutaciones en el gen GJB1 (conexina 32), de las cuales se han descrito más de 300 diferentes. Las mutaciones en el gen GJB1 suelen ser la segunda causa más frecuente de CMT de todos los pacientes CMT con diagnóstico molecular definido (Gess *et al.*, 2013; Lorefice *et al.*, 2017; Saporta *et al.*, 2011; Sivera *et al.*, 2013).

CMTX1 se considera una enfermedad autosómico dominante ligada al X, ya que las mujeres portadoras presentan síntomas clínicos y electrofisiológicos. Normalmente los varones se afectan de forma más precoz y grave que las mujeres y presentan unas velocidades de conducción en rangos intermedios con alargamiento de las latencias distales y de las ondas F (Birouk *et al.*, 1998; Panosyan *et al.*, 2017). Por el contrario, en las mujeres, el estudio neurofisiológico puede demostrar un patrón de tipo axonal con velocidades normales. Estas diferencias entre sexos se deben probablemente a un patrón de inactivación del cromosoma X en las células de Schwann de las mujeres (Siskind *et al.*, 2011) más que a mutaciones específicas, ya que no se ha encontrado ninguna que dé lugar a un fenotipo más grave en función del sexo (Panosyan *et al.*, 2017). Por ello, en los pacientes varones con velocidades intermedias y con patrón de transmisión ligado al X, este suele ser el primer gen que se suele estudiar.

Clínicamente presentan las mismas características que el resto de CMT, pero además pueden tener síntomas a nivel del sistema nervioso central, como lesiones de sustancia blanca transitorias, síntomas del SNC recurrentes, retraso del desarrollo, pérdida auditiva neurosensorial o temblor asociadas a algunas mutaciones en concreto (Wang & Yin, 2016).

En la Tabla 1 presentamos una clasificación basada en la propuesta por el grupo CINBERNED de la Sociedad Española de Neurología en 2012 y que pretende resumir los diferentes tipos y subtipos de CMT (Berciano *et al.*, 2012). Ha sido actualizada con los genes descritos hasta la fecha (Berciano *et al.*, 2017; Rossor *et al.*, 2015; Tazir *et al.*, 2014).

**Tabla 1**

*Clasificación de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.*

TIPO (Número OMIM)	GEN	FENOTIPO ESPECÍFICO
<i>CMT1 Autosómico Dominante</i>		
CMT1A (118220)	17p dup. (PMP22) PMP22 point mutation	CMT1 clásico CMT1, SDS, NCH (raramente recesivo), Intermedio, CMT2.
CMT1B (118200)	MPZ (P0)	CMT1, SDS, NCH, CMT2, (raramente recesivo).
CMT1C (601098)	LITAF	CMT1 clásico
CMT1D (607678)	EGR2	CMT1, SDS, NCH clásicos.
CMT1F (607734)	NEFL	Normalmente CMT2, pero se ha descrito una forma grave con MNCV disminuidas en rango CMT1, (raramente recesivo).
CMT1 plus (614434)	FBLN5	Degeneración macular, cutis laxo, HMN, NCV disminuidas.
SNCV/CMT1 (608236)	ARHGEF10	Disminución de velocidades de conducción asintomáticas.
<i>Neuropatía Hereditaria con Hipersensibilidad a la Presión</i>		
HNPP (162500)	17p del. (PMP22) PMP22 point mutation	HNPP típica. HNPP típica.
<i>CMT1 Autosómica Recesiva o CMT4</i>		
CMT4A (214400)	GDAP1	CMT2, inicio precoz y grave. Asocia parálisis diafragmática y de cuerda vocal.
CMT4B1 (601382)	MTMR2	CMT1 grave. Asocia parálisis facial, bulbar. Pliegues focales de mielina.
CMT4B2 (604563)	SBF2 (MTMR13)	CMT1 grave, glaucoma. Pliegues focales de mielina.
CMT4B3 (615284)	SBF1 (MTMR5)	CMT1 grave. Pliegues focales de mielina.

CMT4C (601596)	SH3TC2	CMT1 grave, escoliosis, sordera. Inclusiones citoplasmas. (Grupo étnico gitano).
CMT4D o HMSNL (601455)	NDRG1	CMT1 grave, sordera, atrofia lingual. (Grupo étnico gitano).
CMT4E (605253)	EGR2	Fenotipo CMT1, SDS, NCH.
CMT4F (614895)	PRX	CMT1, predominantemente sensitivo. Pliegues focales de mielina.
CMT4G o HMSN Russe (605285)	HK1	CMT1 de inicio precoz y grave. Forma clásica CMT1, SDS, CMT2 e intermedio. (Grupo étnico gitano).
CMT4H (609311)	FGD4 (Frabin)	CMT1 clásico, grave.
CMT4J (611228)	FIG4	CMT1 clásico, predominantemente motor, progresivo.
CCFDN (604168)	CTDP1	CMT1 con rasgos dismórficos, cataratas. (Grupo étnico gitano).
CMT4	SURF-1	CMT1 grave. Asocia encefalopatía, ataxia, Sd de Leigh. Menor esperanza de vida.
<i>CMT2 Autosómico Dominante</i>		
CMT2A1 (118210)	KIF1Bb	CMT 2 clásico. Sin adelgazamiento del nervio.
CMT2A2 (609260)	MFN2	CMT2 progresivo, atrofia óptica, afectación del SNC (raramente recesivo).
CMT2B o HSN1B (600882)	RAB7	CMT2 con predominancia sensitiva (complicaciones como úlceras por mutilación).
CMT2C (606071)	TRPV4	CMT2, con predominancia motora, AME distal, atrofia escapulooperonal, parálisis de cuerdas vocales.
CMT2D (601472)	GARS	CMT2 con afectación predominante de las manos.
CMT2E (607684)	NEFL	CMT2 clásico, aunque puede tener NCV en rango CMT1 (raramente recesiva). Hiperqueratosis, hipoacusia.
CMT2F (606595)	HSPB1 (HSP27)	CMT2, con predominancia motora.
CMT2G	12q-q13.2	CMT2 clásico.
CMT2I (607677)	MPZ	CMT2 inicio tardío.
CMT2J (607736)	MPZ	CMT2 con hipoacusia y anormalidades pupilares.
CMT2K (607831)	GDAP1	CMT2 inicio tardío (dominante), CMT2 grave (recesivo). Similar a CMT4A y AR-CMT2K.
CMT2L (608673)	HSPB8 (HSP22)	CMT2, con predominancia motora.
CMTDIB o CMT2M (606482)	DNM2	CMT intermedia o CMT2 clásica. Cataratas, oftalmoplejía, ptosis, temblor.
CMT2N (613287)	AARS	CMT2 clásica.
CMT2O (614228)	DYNC1H1	CMT2 precoz, dificultades de aprendizaje.
CMT2P (614436)	LRSAM1	CMT2 con predominancia sensitiva leve (dominante y recesiva).
CMT2Q (615025)	DHTKD1	CMT2
HMSNP (604484)	TFG	CMT2 con afectación proximal.
CMT2	MARS	CMT2, inicio tardío, con predominancia motora.
CMT2	HARS	CMT2, inicio tardío, con predominancia sensitiva.
CMT2	VCP	CMT2

SPG10 (604187)	KIF5A	CMT, Paraparesia espástica hereditaria.
CMT2	MT-ATP6	CMT2, signos piramidales, curso recurrente.
<i>CMT2 Autosómico recesivo.</i>		
CMT2B1 (605588)	LMNA	CMT2 rápida y grave progresión.
CMT2B2 (605589)	MED25	CMT2 clásico.
CMT2C o CMT2B5	NEFL	CMT2 grave.
NMAN (137200)	HINT1	Forma grave. Neuromiotonía y neuropatía axonal, con predominancia motora. Afectación del SNC.
CMT2R (615490)	TRIM2	CMT2 inicio precoz en la infancia.
AR-CMT2	IGHMBP2	CMT2
AR-CMT2	HSJ1	CMT2
<i>CMT ligado al X</i>		
CMTX1 (302800)	GJB1	Hombres CMT1 (NCV parcheadas); mujeres CMT2.
CMTX4 o Cowchock'ó syndrome (310490)	AIFM1	CMT2, inicio en la infancia, retraso del desarrollo, sordera, dificultades de aprendizaje.
CMTX5 (311070)	PRPS1	CMT2, sordera, atrofia óptica.
CMTX6 (300905)	PDK3	CMT2
<i>CMT Intermedia Dominante</i>		
DI-CMTA (606483)	10q24.1-25.1	CMT1 clásico.
DI- CMTB or CMT2M (606482)	DNM2	CMT intermedio o CMT2, cataratas, oftalmoplejía, ptosis, neutropenia.
DI- CMTC (608323)	YARS	CMT intermedio.
DI-CMTD (607791)	MPZ	CMT intermedio. Afectación pupilar e hipoacusia.
DI-CMTE (614455)	IFN2	CMT intermedio, glomeruloesclerosis focal segmentaria, proteinuria, fallo renal, sordera
DI-CMTF (615185)	GNB4	CMT intermedio.
DI-CMT/NEFL (NA)	NEFL	CMT intermedio.
DI-CMT/MNF2 (NA)	MNF2	CMT intermedio.
DI-CMT/AARS (NA)	AARS	CMT intermedio.
DI-CMT/MDI (NA)	19q13.32	CMT intermedio.
DI-CMT/DCTN2 (NA)	DCTN2	CMT intermedio.
<i>CMT Intermedia Recesiva</i>		
RI- CMTA (608340)	GDAP1	CMT intermedio.
RI-CMTB (613641)	KARS	CMT intermedio, dificultades de aprendizaje, schwannoma vestibular.
RI-CMTC (615376)	PLEKHG5	CMT intermedio, AME.
RI-CMTD (616039)	COX6A1	CMT intermedio, inicio en la primera década.

NOTA: AME: Atrofia muscular espinal; CMT: Charcot-Marie-Tooth; HMN: Neuropatía hereditaria motora; HNPP: Neuropatía hereditaria por hipersensibilidad a la presión; NCH: Neuropatía congénita hipomielinizante; NA: número OMIM no asignado; SDS: Síndrome de Déjerine-Sottas; MNCV: *Motor nerve conduction velocity* (Velocidad de conducción del nervio motor); NCV: *Nerve conduction velocity* (Velocidad de conducción del nervio).

#### 4. EPIDEMIOLOGIA

La enfermedad de CMT es la neuropatía hereditaria más frecuente. Afecta a 1 de cada 2500 personas (Skre, 1974), con una prevalencia en España de 28.2 casos por cada 100000 habitantes (Combarros *et al.*, 1987). En series internacionales, la prevalencia varía del 4.9 (Davis *et al.*, 1978) hasta el 82.3 (Braathen, 2012). Las diferencias en cuanto a prevalencia en los diferentes estudios vienen determinadas por el método de estudio aplicado, las áreas geográficas y las características sociales propias de cada región. Así, en zonas como la cuenca Mediterránea, donde la consanguinidad es más habitual por matrimonios intrafamiliares, las formas recesivas son frecuentes y pueden representar más del 40% de los casos (Dubourg *et al.*, 2006). Sin embargo, en otros países del oeste de Europa, Norteamérica y Japón, las formas dominantes son las más comunes (Siskind & Shy, 2011).

Gracias a los importantes avances en tecnología, actualmente se han descrito más de 1000 mutaciones diferentes repartidas en los más de 80 genes relacionados con esta enfermedad. Sin embargo, en el 90% de los casos las mutaciones encontradas se localizan en los genes PMP22, GJB1, MFN2 y MPZ (Murphy *et al.*, 2012; Saporta *et al.*, 2011). A pesar de ello, no en todos los casos se consigue llegar al diagnóstico genético (Fridman *et al.*, 2015). En el subtipo CMT1, la confirmación genética suele lograrse en torno al 80-98% de los casos, mientras que en las formas CMT2 la tasa de éxito suele ser bastante menor, entre el 25-62% (Murphy *et al.*, 2012; Saporta *et al.*, 2011; Sivera *et al.*, 2013). Los factores epidemiológicos de cada población determinarán las diferencias tanto en la distribución genética como en el éxito diagnóstico.

#### 5. LA ERA DE LA GENÉTICA

La técnica de secuenciación Sanger de genes seleccionados ha sido la más utilizada en el estudio de los pacientes con CMT. Actualmente se sigue utilizando para el análisis de genes candidatos según las

recomendaciones de las guías diagnósticas (Berciano *et al.*, 2012). Sin embargo, la progresiva complejidad genética y la ampliación del espectro fenotípico de cada gen hace que cada vez sea más difícil y menos eficiente en la práctica clínica habitual el diagnóstico genético basado en el estudio gen a gen (Johnson, 2015; Rossor *et al.*, 2013).

Los actuales avances en genética molecular basadas en las técnicas de secuenciación masiva han permitido ampliar las posibilidades diagnósticas en muchas enfermedades genéticas. En la enfermedad de CMT han supuesto una auténtica revolución (Pipis *et al.*, 2019).

El término *next generation sequencing* (NGS) se refiere al conjunto de técnicas de secuenciación masiva y alto rendimiento que permiten realizar la secuenciación genómica de forma paralela y simultánea. Las técnicas comprenden la secuenciación concreta de una serie de genes seleccionados en forma de paneles genéticos; la secuenciación de solo los exones, la parte codificante del genoma, o *whole-exome sequencing* (WES); y la secuenciación de todo el genoma o *whole-genome sequencing* (WGS).

Describimos brevemente cada una de las técnicas.

### 5.1 Paneles genéticos

Los paneles genéticos son una prueba genética en la que se analizan simultáneamente y en profundidad una serie de genes específicos relacionados con el CMT en función de la orientación fenotípica. Al analizar simultáneamente muchos genes, el rendimiento coste-efectivo es mayor. Por ello se consideran una buena opción en la práctica clínica habitual (Lupo *et al.*, 2016; Rossor *et al.*, 2013).

El éxito diagnóstico de los paneles genéticos en CMT se encuentra en torno al 30-40%, una vez descartadas las mutaciones más frecuentes, como la duplicación en PMP22, y en función de cómo se analicen las variantes encontradas (Antoniadi *et al.*, 2015; Bacquet *et al.*, 2018; Cortese *et al.*, 2020; Petra

Laššuthová *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). La utilidad de los paneles va a depender de las características del propio panel y de la familia sujeta a estudio. Por un lado, los paneles deben ir actualizándose y adaptándose a las características genéticas de la población en cuestión (Rossor *et al.*, 2013). En segundo lugar, los individuos con un patrón desmielinizante, de inicio precoz y con historia familiar positiva presentarán una mayor probabilidad de éxito diagnóstico (Cortese *et al.*, 2020).

Los paneles nos van a ofrecer información sobre las variantes de nucleótido único (SNVs, *single nucleotide variants*) en los genes seleccionados como mutaciones *missense* o *inframe*. Algunos estudios han descrito el diseño de paneles combinados con softwares específicos de análisis de la variación en el número de copias (CNV, *copy number variant*), los cuales permiten una cobertura suficiente, por ejemplo, de la duplicación de 1.4Mb en la región 17p12 del gen PMP22 relacionado con CMT1A (Nam *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Esto ampliaría la utilidad de los paneles como primera opción diagnóstica en muchos casos.

## 5.2 Whole-exome sequencing

En la técnica WES se lleva a cabo la amplificación y secuenciación de todos los exones, es decir, de las regiones codificantes de proteínas. En su conjunto se corresponden con el 1-2% de todo el genoma.

Las tasas de éxito diagnóstico en pacientes diagnosticados de CMT varían en torno al 25-46% según las series (Choi *et al.*, 2012; Gonzaga-Jauregui *et al.*, 2015; Hartley *et al.*, 2018; Walsh *et al.*, 2017; Yaping Yang *et al.*, 2014). Gracias a esta técnica se han identificado nuevos genes relacionados con CMT que previamente no habían sido descritos.

Actualmente el WES solo es capaz de cubrir el 96% de todo el exoma con unas tasas todavía demasiado altas de falsos negativos. Sin embargo, de forma progresiva se ha conseguido mejorar el

promedio en la profundidad de lectura dando lugar a una mayor resolución y capacidad para detectar SNVs, *indels* (pequeñas inserciones o deleciones) e incluso variantes genómicas de >50bp (SVs) (Pipis *et al.*, 2019). Además, las nuevas herramientas bioinformáticas (CONIFER, ExomeCNV, CEQer) son capaces de llevar a cabo un análisis computacional específico que nos permite identificar incluso CNV como, por ejemplo, el reordenamiento de 17p en CMT1A y HNPP (Jo *et al.*, 2016), ampliando sus aplicaciones y posibilidades diagnósticas.

### **5.3 Whole-genome sequencing**

La técnica WGS es el proceso por el cual se lleva a cabo la secuenciación completa de todo el genoma. Esto permite el análisis tanto de las partes codificantes (exones) como de las no codificantes (intrones).

Una de sus ventajas es que presenta una cobertura de lectura de las zonas exómicas incluso superior al WES (alrededor del 98.4-100%). Sin embargo, en algunos estudios se ha descrito la necesidad de confirmar mediante una segunda técnica de secuenciación las inserciones y deleciones encontradas (Dewey *et al.*, 2014). Esta tasa de falsos resultados podría mejorarse incluyendo una técnica WGS PCR-free (Meienberg *et al.*, 2016). Otro problema del WGS es que proporciona un número enorme de variantes que requieren sistemas de interpretación extremadamente eficientes.

Actualmente esta técnica se reserva para proyectos de investigación, con una utilidad mucho más limitada en la práctica clínica habitual. Normalmente se inicia el estudio con un panel genético y si el resultado es negativo se valora completar el análisis con WES, y en menor medida con WGS (Rossor *et al.*, 2013).

## 5.4 Interpretación de los resultados

Los paneles y las técnicas de WES y WGS dan lugar a una gran cantidad de información. Vamos a encontrar nuevas variantes tanto en genes ya conocidos como en otros no asociados con la enfermedad hasta la fecha. Por lo tanto, la mayor dificultad radica en la interpretación adecuada de los resultados (Lupo *et al.*, 2016).

Para el análisis de los datos es fundamental seguir las directrices y criterios de la *American College of Medical Genetics and Genomics* (Richards *et al.*, 2015). Según sus recomendaciones, los términos “mutación” y “polimorfismo” se sustituyen por “variante” con el fin de evitar confusiones. La patogenicidad de estas se clasifica siguiendo una serie de criterios y mediante un gradiente de mayor a menor probabilidad en: patogénica, probablemente patogénica, de significado incierto, probablemente benigna y benigna (den Dunnen *et al.*, 2016).

Cada una de las variables debe interpretarse con cautela y siguiendo numerosos criterios:

- Fenotipo y patrón de herencia compatible con alguno de los genes descritos.
- Presencia de la variante en la literatura científica y bases de datos como ClinVar, OMIM, *Human Gene Mutation Database*, HGVS databases o DECIPHER.
- Presencia de la variable en la población general. Las bases de datos poblacionales como 1000Genomes, gnomAD, *NHLBI Exome Sequencing Project (Exome Variant Server)* así como los recursos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para la revisión de datos en la literatura científica son útiles para determinar la frecuencia alélica de una variante. Si la variante alélica encontrada es frecuente en la población general por encima de un porcentaje determinado es bastante probable que la clasifiquemos como no patogénica y viceversa.
- Análisis computacional de la variante. Estos son fundamentales, pero no totalmente determinantes. Los algoritmos llamados *in silico* permiten predecir con mayor o menor exactitud la

probabilidad de que una variante *missense* sea patogénica o no. Los más conocidos son PolyPhen, SIFT y Mutation Tasser. Para determinar la patogenicidad de la variante se basan en si ese nucleótido o aminoácido se encuentra en un locus altamente conservado evolutivamente, si afecta de forma significativa a la secuencia de la proteína resultante y en los efectos bioquímicos que puede tener la sustitución del aminoácido. Existen también algoritmos para predecir la probable patogenicidad de variantes que afecten al *splicing* como son GenSplicer, Human Splicing Finder o NetGene2. Es importante que se lleve a cabo un análisis con varias de estas herramientas ya que cada una tiene sus ventajas y desventajas, y así poder analizar la variante en su totalidad y desde diferentes algoritmos (Richards *et al.*, 2015).

- Finalmente, si es posible, se deben llevar a cabo estudios funcionales para valorar el efecto de la variable en la estructura y funcionalidad de la proteína.

El propósito de estos estudios es el de guiar las decisiones médicas. Dada la complejidad de la interpretación de algunas de las variables, es evidente que se debe llevar a cabo un trabajo conjunto desde el punto de vista clínico y genético, tanto en el análisis fenotípico como en su correspondencia a nivel molecular, con el fin de evitar conclusiones erróneas o incompletas.

### **5.5 Limitaciones de las técnicas de *next generation sequencing***

Las técnicas de NGS identifican adecuadamente variantes de nucleótidos únicos o pequeñas inserciones o deleciones. Sin embargo, tienen el inconveniente de que no son capaces de identificar grandes reordenaciones del genoma. Para ello se recomienda el uso de técnicas de secuenciación Sanger, MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) o *arrays* (*array comparative genomic hybridization*) (Rossor *et al.*, 2013). Sin embargo, tal y como hemos descrito previamente, gracias a la aplicación de algoritmos informáticos, se está consiguiendo analizar CNV a partir de los datos obtenidos con las técnicas de NGS (Jo *et al.*, 2016; Nam *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016).

Otro de los problemas es que, debido al descubrimiento progresivo de nuevos genes, sus interpretaciones pueden quedar obsoletas rápidamente. Pero lejos de ser un inconveniente, esto es una ventaja añadida. Los datos obtenidos no caducan y la acumulación constante y progresiva de conocimiento nos permite una nueva evaluación sin tener que repetir la secuenciación. Variantes de significado incierto pueden pasar a ser patogénicas o todo lo contrario al valorarlas con la nueva información. En un estudio reciente se describió que el análisis de los datos obtenidos mediante WEG 3 años después podía dar lugar a un diagnóstico definitivo hasta en un 13% de los casos pendientes de resolver (Hiatt *et al.*, 2018).

El coste económico es todavía una limitación para su uso generalizado. Sin embargo, con el avance tecnológico estas técnicas serán cada vez más rentables económicamente y accesibles a la práctica clínica habitual (Walsh *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016).

## 6. TRATAMIENTO

Actualmente el tratamiento en la enfermedad de CMT es conservador. Se basa en la combinación de las técnicas de rehabilitación y la cirugía. No disponemos todavía de tratamientos curativos ni modificadores de la enfermedad de forma efectiva, aunque se han desarrollado diferentes ensayos clínicos con resultados poco satisfactorios.

### 6.1 Tratamiento rehabilitador

La rehabilitación juega un papel fundamental en estos pacientes, tanto en el mantenimiento de la fuerza y marcha como en la mejoría de la calidad de vida (Kenis-Coskun & Matthews, 2016).

El **ejercicio físico** regular es muy importante. El sedentarismo y una actividad física reducida derivadas de las limitaciones motoras empeoran claramente la clínica basal y se relacionan con una mayor fatiga. Mediante ejercicios reglados y supervisados se consigue mantener la fuerza y un buen acondicionamiento físico (Chetlin *et al.*, 2004). El entrenamiento aeróbico ha demostrado una clara mejora de la resistencia al ejercicio (Wallace *et al.*, 2019) y la práctica de ejercicios de estiramiento y de propiocepción complementan adecuadamente la rehabilitación (Mori *et al.*, 2020). De esta forma se evita la aparición de deformidades y dolor articular. Aunque no podemos afirmar claramente que el entrenamiento controlado ralentice la progresión de la enfermedad, los pacientes sí presentan una clara percepción subjetiva de mejoría clínica en general (El Mhandi *et al.*, 2008).

Los **dispositivos ortopédicos** (Figura 6) son otro de los pilares en el tratamiento rehabilitador. Lo ideal es que la ortesis sea personalizada e indicada por un profesional, tras la evaluación de los ángulos de movimiento, la fuerza de cada músculo y la comodidad. Su uso en miembros inferiores permite mejorar el control postural, la marcha y disminuye el uso energético en estos pacientes. Las ortesis de tobillo son las más frecuentes. En miembros superiores, el uso de una férula de oposición del pulgar ha demostrado una mejoría significativa en la destreza manual (Guillebastre *et al.*, 2011).

**Figura 6**

*Dispositivos ortopédicos.*



NOTA: A. Ortesis antequino de tobillo. B. Férula de oposición del pulgar.

## 6.2 Tratamiento quirúrgico

La cirugía ha sido siempre un elemento terapéutico fundamental para la corrección de las deformidades presentes en la enfermedad de CMT. Las técnicas quirúrgicas en los pies comprenden artrodesis multiplanares, osteotomías, corrección de los dedos en garra y pie caído y transposiciones de tejidos blandos (Figura 7) (Dreher *et al.*, 2015; Louwerens, 2018; Pfeffer *et al.*, 2020). De esta forma se pretende proporcionar un mejor equilibrio de fuerzas y ayudar a corregir los movimientos del pie, reduciendo las contracturas y la atrofia muscular que darían lugar finalmente a una deformidad fija.

**Figura 7**

*Corrección de pie cavo mediante osteotomía de Inhäuser en paciente con CMT1.*



NOTA: A-b: preoperatorio, c-d: postoperatorio. Extraído de “*Hereditary Peripheral Neuropathies*” (Forst & Ingenhorst, 2005).

Uno de los problemas a los que nos enfrentamos es que se trata de una patología crónica, por lo que en muchos de ellos es necesario repetir las cirugías correctoras. Además, en estos pacientes la afectación es bilateral y la neuropatía dificulta la propia cicatrización, mientras facilita la aparición de úlceras y de dolor crónico.

Actualmente, una intervención conjunta basada en una cirugía funcional asociada a una terapia rehabilitadora intensiva precoz mejora el pronóstico funcional y el rendimiento en estos pacientes (Ferraro *et al.*, 2017).

### **6.3 Terapia molecular**

En los últimos años se ha producido un gran avance en el desarrollo de tratamientos para la enfermedad de CMT, tanto en forma de ensayos como de estudios preclínicos. A pesar de que los resultados no han sido suficientemente positivos y las dificultades aún existentes en la medicina traslacional, toda esta investigación nos ha permitido reflexionar y mejorar el diseño de estos trabajos.

Como hemos estado viendo, la enfermedad de CMT presenta una gran heterogeneidad tanto clínica como genética y una evolución clínica muy lenta. A la hora de diseñar los ensayos clínicos debemos tener en cuenta estas características. Es fundamental determinar claramente el subgrupo de pacientes sujetos a estudio, así como los objetivos primarios y secundarios. A nivel experimental, estos objetivos deben ser congruentes con la fisiopatología de la enfermedad y la molécula en estudio. A nivel clínico, estos objetivos deben ser realistas y ajustados a lo realmente medible y relacionado con la calidad de vida de los pacientes (Rossor *et al.*, 2020).

#### **6.3.1 Estudios realizados en CMT1A**

La forma CMT1A es la más frecuente y por ello la mayoría de los ensayos clínicos se han desarrollado en este subtipo. En la actualidad disponemos de la información obtenida de los ensayos clínicos en humanos ya realizados o en proceso de análisis y de los ensayos experimentales realizados en animales.

- **Ensayos clínicos realizados en humanos.**

Los estudios con **ácido ascórbico** se empezaron a desarrollar gracias al descubrimiento de su potencial como promotor de la mielinización tanto en modelos *in vitro* (Perea *et al.*, 2001) como en modelos animales (Passage *et al.*, 2004). Kaya *et al.* (2007) demostraron posteriormente que esta regulación podría estar mediada por la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa y la reducción de los niveles de cAMP intracelular, lo cual a su vez activaría un represor del promotor de PMP22 (Sabéran-Djoneidi *et al.*, 2000). Sin embargo, los ensayos realizados en humanos no consiguieron demostrar ningún efecto beneficioso ni con dosis altas ni al aumentar el seguimiento 2 años (Burns *et al.*, 2009; Camiel Verhamme *et al.*, 2009; Gess *et al.*, 2015; Lewis *et al.*, 2013; Pareyson *et al.*, 2011), y todavía hoy en día no se ha conseguido aclarar si este tratamiento es realmente efectivo o no en pacientes con CMT1A.

Otra de las estrategias que se ha desarrollado en CMT1A es la de combinación de los fármacos baclofeno, sorbitol y naltrexona, conocido con el nombre de **PXT3003**. Tras estudiar sus mecanismos de acción y sus posibilidades como reguladores de los genes de la mielina, se seleccionaron como posibles herramientas terapéuticas en CMT. En el estudio con modelos tanto *in vivo* como *in vitro*, su acción conjunta disminuyó la expresión del mRNA de PMP22 en las células de Schwann de los ratones transgénicos, mejorando así la mielinización (Chumakov *et al.*, 2014). La administración de PXT3003 de forma precoz mejoró significativamente los déficits motores del ratón, abriendo la ventana a la posibilidad de valorar la terapia en pacientes jóvenes (niños y adolescentes) (Prukop *et al.*, 2019). Un estudio en fase II demostró su tolerabilidad y eficacia en humanos (Attarian *et al.*, 2014). Actualmente ha finalizado un estudio en fase III cuyos resultados están pendientes de publicación (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03023540).

- **Ensayos preclínicos en modelos animales.**

Siguiendo la misma estrategia de reducción de los niveles de PMP22, se han publicado otros estudios en fase preclínica en modelos animales.

Melcangi *et al* (1999) demostraron que la progesterona y sus derivados podían influir en la expresión de PMP22 en ratas. A partir de ese momento se realizaron estudios en modelos animales con **onapristona**, un antagonista del receptor de la progesterona (Sereda *et al.*, 2003; Zu Horste *et al.*, 2007). Estos estudios demostraron una disminución de la expresión de PMP22 y una mejoría de la neuropatía clínica. Sin embargo, las dudas existentes actualmente sobre su toxicidad han impedido el desarrollo de ensayos clínicos en humanos, de forma que su eficacia queda pendiente de confirmar en pacientes con CMT1A.

Además de las moléculas que pueden influir directamente sobre la expresión de PMP22, existe una serie de **técnicas de ingeniería genética** que han sido estudiadas en estudios preclínicos en CMT como son el uso de oligonucleótidos antisentido (ASOs), RNAs de interferencia, vectores virales para el reemplazamiento de genes y la técnica CRISPR-Cas9. Una de las estrategias emergentes más prometedoras en las enfermedades genéticas neuromusculares es el uso de **oligonucleótidos antisentido**. El estudio realizado en ratas transgénicas demostró que la inyección de un ASO frente a PMP22 daba lugar a una reducción de los niveles de mRNA asociado a una mejoría de la función motora y de las velocidades de conducción y amplitud del CMAP, así como un mayor número de fibras mielinizadas (Zhao *et al.*, 2018). El uso de un **RNA de interferencia** en un modelo murino con una mutación específica en PMP22 demostró resultados similares (Lee *et al.*, 2017). A pesar de estos resultados prometedores, por el momento es todavía difícil extrapolar la terapia génica a los humanos.

Otra de las técnicas que se plantean es la mejora clínica al actuar directamente a nivel de la degeneración axonal. La administración exógena intramuscular en ratones transgénicos del **factor de**

**crecimiento neurotrofina-3 (NT-3)** (Jessen & Mirsky, 1999; Meier *et al.*, 1999) mediada por vectores virales (scAAV1.tMCK.NTF3) demostró una mejoría en la regeneración neuronal al estimular la proliferación y diferenciación de las células de Schwann, permitiendo de esta manera el crecimiento de nuevo del axón. Al actuar no sobre el gen si no sobre la consecuencia final, se abre la posibilidad de usar esta estrategia terapéutica a los diferentes subtipos de CMT (Sahenk & Ozes, 2020).

Las células de Schwann se diferencian de forma defectuosa en las fases tempranas de la enfermedad por un desequilibrio en la actividad de las vías de señalización intracelular PI3K-Akt y Mek-Erk. Siguiendo la línea de actuar sobre el daño axonal y no directamente sobre el gen PMP22, Friederich *et al* (2014) demostraron en un modelo murino transgénico de PMP22, que la sobreexpresión de la neuregulina-1 (NRG1) a nivel axonal mediante su administración en forma soluble en las fases tempranas de la enfermedad, mejoró la señalización de esta vía. Esto dio lugar a una estimulación de la diferenciación de las células del Schwann y a una preservación de la supervivencia de los axones a largo plazo. Esto realza de nuevo la importancia de la preservación de las células de Schwann de forma precoz como herramienta terapéutica importante.

En conclusión, los estudios en terapia génica en CMT son cada vez más frecuentes y desde diferentes abordajes. El objetivo final no solo es mejorar la mielinización, sino también los déficits clínicos dependientes fundamentalmente del daño axonal de forma significativa y precoz. El futuro del tratamiento de esta enfermedad radica en la combinación de la rehabilitación y ejercicio físico controlado junto con las nuevas dianas genéticas aún en fases de investigación y desarrollo.



## **OBJETIVOS**



## II. OBJETIVOS

### 1. PRINCIPALES

- Identificar, reunir y clasificar a todos los pacientes con diagnóstico de sospecha de neuropatía genética correspondientes al área de salud del Hospital General de Alicante, con el fin de crear una base de datos para realizar futuros estudios clínicos, epidemiológicos y genéticos.
- Describir la prevalencia de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth en dicha área de salud.
- Clasificación de los pacientes en función de sus características clínicas, electrofisiológicas y genéticas en cada uno de los grupos vigentes en la actualidad.
- Realizar una descripción detallada del grupo CMT1, concretamente el subgrupo 1A.
- Identificar a los pacientes con CMT1 no debidos a mutaciones en el gen PMP 22.
- Describir las mutaciones encontradas. Realizar los estudios genéticos necesarios, incluyendo análisis de segregación, comparación con bases de datos y estudios genéticos de laboratorio con el objetivo de determinar la patogenicidad de las nuevas mutaciones encontradas.
- Establecer las correlaciones clínicas, eléctricas y genéticas con las diferentes mutaciones encontradas.

### 2. SECUNDARIOS

- Comparar la población del área de salud del Hospital General de Alicante con las descritas en la literatura, tanto en el aspecto genético como el clínico.

- Iniciar las bases clínicas para crear modelos experimentales con las mutaciones encontradas para mejorar el conocimiento de la fisiopatología de estas enfermedades.

# MATERIAL Y MÉTODOS



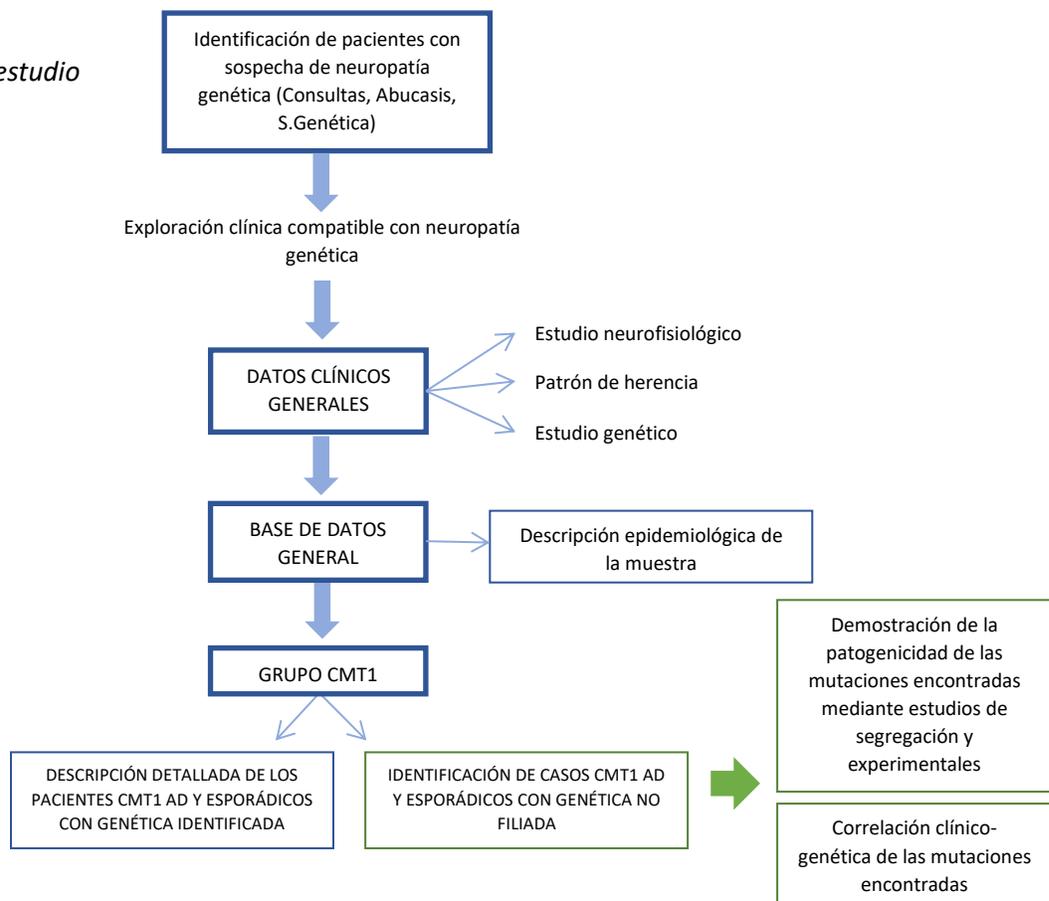
### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1. DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO

En el diseño de este trabajo se pueden considerar dos partes diferenciadas (Figura 8). La primera parte es un estudio de **tipo observacional descriptivo y retrospectivo** de un grupo de pacientes afectos de neuropatía genética correspondiente al Departamento de Salud 19 de la Agencia Valenciana de Salud (Hospital General Universitario de Alicante). En esta parte se pretende realizar una descripción epidemiológica global y determinar la prevalencia de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth a fecha de junio 2018. Asimismo, se realiza la descripción clínica detallada del subgrupo de pacientes con formas desmielinizantes con patrón autosómico dominante (CMT1 AD) y esporádicos genéticamente confirmados.

**Figura 8**

*Fases del estudio*



La segunda parte incluye un estudio de **tipo descriptivo y experimental** basado en la descripción específica de las nuevas mutaciones identificadas en el grupo CMT1 AD y CMT1 casos esporádicos, la demostración de su patogenicidad mediante estudios de segregación y experimentales, así como su correlación clínica. Esta parte fue realizada en colaboración con el Instituto de Neurociencias y la Universidad Miguel Hernández.

## 2. IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE PACIENTES

Los pacientes participantes en el estudio fueron seleccionados en la Consulta especializada en patología neuromuscular del Servicio de Neurología del Hospital General Universitario de Alicante entre enero de 2015 y junio de 2018.

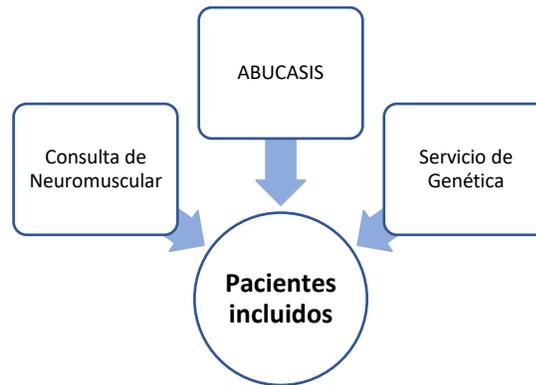
La identificación de estos pacientes se llevó a cabo siguiendo diferentes estrategias (Figura 9). Primeramente, se incluyeron aquellos pacientes que estaban siendo atendidos por sospecha de neuropatía de origen genético. Simultáneamente se realizó una búsqueda en el sistema informático ABUCASIS (sistema informático de registro de información médica empleado en la asistencia ambulatoria de la Comunidad Valenciana), de todos los pacientes mayores de 18 años con diagnóstico de “Neuropatía hereditaria” (CIE 10 G60.9) en el Departamento 19. A su vez, se solicitó al Servicio de Genética una lista de todos los pacientes a los cuales se les habían solicitado estudios genéticos por enfermedades de tipo neuromuscular procedentes de nuestra consulta.

Una vez identificados estos pacientes, se llevó a cabo una revisión manual retrospectiva de las historias clínicas utilizando el programa ABUCASIS y se seleccionó a los candidatos al estudio. Los datos cruciales de la exploración clínica sugestivos de neuropatía genética fueron la presencia de síntomas y signos sensitivo-motores distales, una lenta progresión y la presencia de deformidades óseas tales como

pies cavos y retracción aquilea.

**Figura 9**

*Origen y flujo de pacientes*



Para el recuento total de pacientes afectados se **incluyó** a aquellos con sospecha de neuropatía genética por datos clínicos y en la exploración, de los cuales podíamos disponer o no de estudio neurofisiológico o genético confirmatorio. Se **excluyeron** aquellos casos en los que tras revisión se confirmó un diagnóstico distinto al de neuropatía hereditaria, por codificación errónea en el sistema o genética compatible con otro proceso distinto, o bien por negativa del paciente a participar en el estudio, o por fallecimiento.

### 3. RECOGIDA DE DATOS

La recogida de la información de los pacientes seleccionados se realizó mediante la revisión de sus historias clínicas en el programa ABUCASIS, así como durante las visitas presenciales programadas y extraordinarias. En algunos casos se contactó telefónicamente con el paciente a fin de completar y actualizar los datos necesarios tras haber sido valorados presencialmente de forma previa.

De forma general se recogieron los datos referentes al tipo de CMT determinado por el estudio neurofisiológico (desmielinizante, intermedio, axonal, normal o no realizado), familiares afectados, patrón de herencia y genes testados.

### **3.1. Estudios neurofisiológicos**

En todos los pacientes con sospecha de neuropatía genética de los cuales no se disponía de estudio neurofisiológico se propuso su realización para su caracterización en desmielinizante, axonal o intermedio. En dicho estudio se incluyó la determinación de las velocidades de conducción motora y sensitiva en al menos 3 nervios, siendo determinante de CMT1 o desmielinizante una NCV <38 m/s, CMT intermedio una NCV entre 25-45 m/s y CMT 2 o axonal una NCV >38 m/s. El estudio neurofisiológico fue realizado en todos los pacientes que aceptaron la prueba, tanto casos índices como familiares. No se realizó en aquellos en los que ya se disponía de un estudio neurofisiológico previo, si existía un diagnóstico molecular conocido o si el paciente se oponía a la prueba.

### **3.2. Patrón de herencia**

La enfermedad de CMT sigue un patrón de transmisión de tipo mendeliano, lo que nos permite clasificar a los pacientes en función de la forma de herencia más probable. Para ello se tuvieron en cuenta los antecedentes familiares descritos por el paciente y los individuos explorados de cada familia.

Los pacientes fueron clasificados con patrón de herencia autosómico dominante, autosómico recesivo o ligado al X en función de la distribución de los familiares afectados en cada generación, tal y como se ha descrito previamente. Se clasificaron como casos esporádicos aquellos pacientes sin

antecedentes familiares disponibles o conocidos o, en caso de que los hubiera, si tras su evaluación clínica se confirmó que no estaban afectados.

### 3.3. Estudios genéticos

Una vez clasificados los pacientes clínicamente en función del perfil neurofisiológico y el patrón de herencia, se llevó a cabo el estudio genético inicial de cada uno de ellos si no se disponía de diagnóstico molecular conocido (Figura 10). Esto se llevó a cabo con base en el algoritmo propuesto por el grupo de enfermedades neuromusculares de la Sociedad Española de Neurología e investigadores del grupo CINBERNED (Berciano *et al.*, 2012).

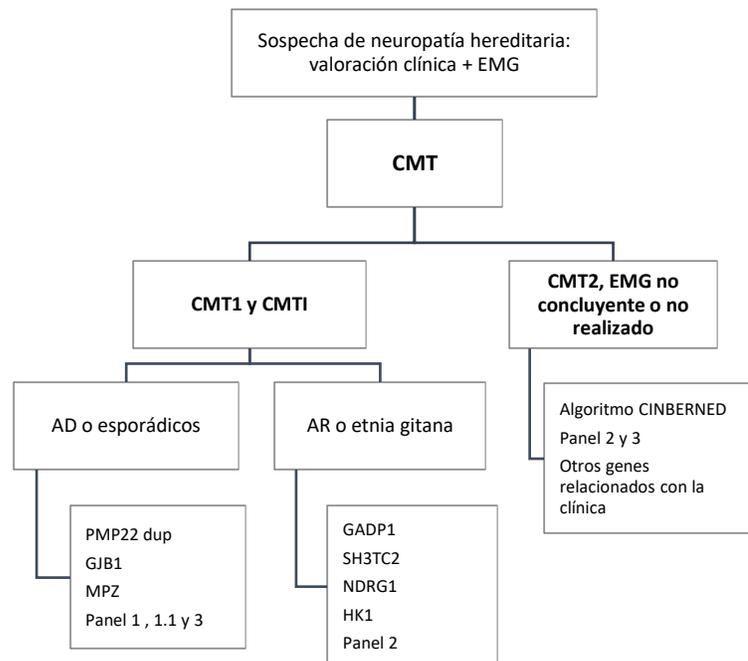
En los pacientes con patrón CMT1 AD, CMT1 esporádicos y CMTI se solicitó primeramente la identificación de la duplicación del gen PMP22 mediante la técnica MLPA. En caso de resultado negativo, se analizaron los genes GJB1 (excepto si hubiera evidencia de transmisión varón-varón) y MPZ. En los pacientes con patrón CMT1 AR o en caso de etnia gitana, se solicitaron inicialmente los genes específicos recomendados (GADP1, SH3TC2, NDRG1, HK1). Si en estos grupos todos estos genes resultaban negativos, el paciente quedaba definido como “gen no filiado”. En algunos pacientes se amplió el estudio mediante el panel genético completo de CMT (Panel 1), panel genético reducido de CMT (Panel 1.1) y panel de etnia gitana (Panel 2) de la empresa “Sistemas Genómicos” (cubierto por el Sistema Nacional de Salud). En otros casos seleccionados el estudio genético se completó en colaboración con la unidad de referencia de Patología Neuromuscular del Servicio de Neurología del Hospital La Fe de Valencia (Panel 3).

En el grupo de pacientes CMT2, con estudio EMG no concluyente o no realizado se solicitaron los genes sospechosos guiados por la clínica y el algoritmo propuesto en cada caso. En algunos de ellos se amplió también el estudio genético mediante el Panel 3.

No se incluyeron en la descripción los resultados de analíticas ordinarias, ya que en estos pacientes son normales. Tampoco se describieron estudios de biopsia de nervio periférico, al ser una prueba que no se realiza de forma rutinaria. Esta última técnica se reserva cuando existen dudas diagnósticas que incluyan la posibilidad de neuropatías adquiridas como las asociadas a patología inflamatoria (vasculitis) o disimmune (CIDP) o neuropatías por depósito (PNP amiloidea hereditaria, enfermedad de Fabry) (King & Ginsberg, 2013).

**Figura 10**

*Genes testados en cada grupo fenotípico de CMT*



- **PANEL 1 completo (34 genes):** Incluye los genes AARS, ARHGEF10, DNM2, DYNC1H1, EGR2, FDG4, FIG4, GARS, GADP1, GADP1L1, GJB1, HK1, HSPB1, HSPB8, KARS, KIFB1, LITAF, LMNA, LRSAM1, MED25, MFN2, MPZ, MTMR2, NDRG1, NEFL, PRX, PMP22, PRPS1, RAB7A, SBF2, SH3TC2, SPTLC1, TPRV4, YARS.

- **PANEL 1.1 reducido (25 genes):** Incluye los genes EGR2, FDG4, FIG4, GARS, GADP1, GJB1, HK1, HSPB1, HSPB8, KIF1B, LITAF, LMNA, MED25, MFN2, MPZ, MTMR2, NDRG1, NEFL, PRX, PMP22, PRPS1, RAB7A, SBF2, SH3TC2, TPRV4.
- **PANEL 2 (10 genes):** Incluye los genes específicos de etnia gitana GADP1, MTMR2, SBF2, SH3TC2, NDRG1, EGR2, PRX, HK1, FDG4, FIG4.
- **PANEL 3 (H. La Fe, 28 genes):** Incluye los genes AARS, DNM2, EGR2, FDG4, FIG4, GARS, GADP1, GJB1, HK1, KARS, KIF1B, LITAF, LMNA, LRSAM1, MED25, MPZ, MTMR2, NDRG1, NEFL, PRX, PMP22, PRPS1, RAB7A, SH3TC2, SPTLC1, TRPV4, SBF2, YARS.

#### 4. DESCRIPCIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LA MUESTRA

Tras reunir todos los datos y con el fin de realizar una descripción epidemiológica y genética básica, se realizó una tabla en la que se clasificó a los pacientes en diferentes subgrupos en función del tipo de CMT basado en los hallazgos neurofisiológicos, el patrón de herencia y los estudios genéticos (genes testados y resultados) (Tabla 2).

Dentro del grupo de “otros diagnósticos” se incluyó a aquellos pacientes con diagnóstico de neuropatía hereditaria exclusivamente motora (HMN) o sensitiva (HSAN), con afectación de fibra fina u otro tipo de neuropatía hereditaria o adquirida. Asimismo, fueron excluidos del grupo de análisis de CMT los diagnosticados como HNPP.

**Tabla 2**

*VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS DEL GRUPO DE PACIENTES CON NEUROPATÍAS GENÉTICAS SELECCIONADAS PARA EL ESTUDIO*

VARIABLE	PACIENTE	Nº DE FAMILIARES AFECTOS	TIPO CMT (PATRÓN DE HERENCIA + EMG)	GENES TESTADOS	RESULTADO
<i>Tipo</i>	Codificación numérica	Cualitativa discreta	Cualitativa discreta	Cualitativa discreta	Cualitativa discreta
<i>Descripción</i>	1	Familiares afectos (incluido el probando).	CMT1 AD	Descripción de los genes testados en las pruebas genéticas.	Resultado obtenido en las pruebas genéticas.
	2		CMT1 AR		
	3		CMT1 esporádico.		
	...		CMT2 AD		
			CMT2 AR		
			CMT2 esporádico		
			CMTX		
			CMT Intermedio		
			HNPP		
			EMG no concluyente		
	EMG no disponible				
	Otros diagnósticos				

## 5. DESCRIPCIÓN CLÍNICO-GENÉTICA DEL GRUPO CMT1 AUTOSÓMICO DOMINANTE Y CASOS ESPORÁDICOS

### 5.1. Descripción detallada del tipo Charcot-Marie-Tooth tipo 1A

Se seleccionaron una serie de variables a partir de la revisión de la literatura científica según los objetivos del estudio y basándonos en los datos exigidos en la web CIBERER (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras) del registro español de enfermedades neuromusculares ([www.nmd-es.org](http://www.nmd-es.org)) (Tabla 3). Se creó una base de datos en formato Excel para la representación de la información de manera anónima. En esta se incluyeron los casos índices de las familias de los pacientes diagnosticados como CMT1A.

**Tabla 3***Variables de características clínicas de CMT1A seleccionadas para el estudio*

VARIABLES	TIPO	DESCRIPCIÓN
<i>Variables generales y epidemiológicas</i>		
Sexo	Cualitativa dicotómica	H/M
Edad actual (años)	Cualitativa discreta	Edad actual del paciente en el momento en el que se realiza el estudio.
Edad inicio de los síntomas (años)	Cualitativa ordinal	Valorado de 0-7 en función de la edad del paciente en el momento en el que se inician los primeros síntomas de CMT1. 0: Nacimiento 1: Retraso del desarrollo motor (>18m) 2: 2-10 años 3: 11-20 años 4: 21-30 años 5: 31-40 años 6: > 40 años 7: Incapaz de precisar
Edad de diagnóstico (años)	Cualitativa discreta	Edad del paciente en el momento en el que se realiza el diagnóstico de CMT1A.
Familiares afectos	Cualitativa discreta	Número de familiares afectos (sin contar al paciente probando).
Tipo de herencia	Cualitativa ordinal	Valorado de 0-4 en función de los antecedentes familiares descritos por el paciente y los registros clínicos disponibles. 1: AD (Transmisión varón-varón) 2: AR (Padres examinados) 3: Ligada al X 4: Esporádica
Comorbilidades	Cualitativa dicotómica	Sí/No (determinado por antecedentes médicos recogidos en la anamnesis).
<i>Características clínicas</i>		
<b>BALANCE MOTOR</b> <i>Regiones exploradas:</i> Facial Bulbar	Cualitativa ordinal	Valorado de 0-5 (Determinado por la exploración clínica del paciente según la escala de fuerza muscular modificada (MRC)).

MMSS proximal MMSS distal Interóseos Primer dedo MMII proximal MMII distal Primer dedo		0: parálisis total (ausencia de contracción) 1: fuerza mínima (contracción muscular visible sin movimiento) 2: fuerza escasa (movimiento activo sin vencer gravedad) 3: fuerza regular (movimiento activo contra gravedad sin vencer resistencia) 4: fuerza buena (movimiento activo contra gravedad y resistencia) 5: fuerza normal (movimiento completo contra resistencia total)
<b>REFLEJOS</b> <i>Regiones exploradas:</i> Bicipital Tricipital Estilorradial Rotuliano Aquileo	Cualitativa ordinal	Valorado de 0-4 (Determinado por la exploración clínica del paciente). 0: abolición de reflejos 1: hiporreflexia (reflejos disminuidos) 2: reflejos normales 3: hiperreflexia (reflejos aumentados) 4: clonus (agotable o inagotable)
<b>ATROFIA MUSCULAR</b>  <i>Regiones exploradas:</i> Interóseos Eminencia tenar MMSS distal Músculo pedio MMII distal	Cualitativa dicotómica	Sí/No (Determinado por la exploración clínica del paciente).
<b>MALFORMACIONES ÓSEAS</b>  <i>Regiones exploradas:</i> Pies cavos Retracción aquilea Mano garra Dedo martillo Escoliosis Otras	Cualitativa dicotómica	Sí/No (Determinado por la exploración clínica del paciente).
<b>SENSITIVO</b>  Hipoestesia táctil Hipoestesia vibratoria Hipoestesia dolorosa	Cualitativa dicotómica	Sí/No (Determinado por la exploración clínica del paciente).

<b>Hipoestesia propioceptiva</b>		
<b>OTROS SÍNTOMAS</b>	Cualitativa dicotómica	Sí/No (Determinado por la anamnesis y la exploración clínica del paciente).
Afectación cognitiva		
Degeneración macular		
Reactividad pupilar		
Atrofia óptica		
Nistagmo		
Oculomotores		
Atrofia lingual		
Hipoacusia		
Disfonía		
Disartria		
Ataxia sensitiva		
Piramidalismo		
Cerebelo		
Temblor		
Calambres		
Síntomas autonómicos		
Otros		
<b><i>Escala funcional de la marcha</i></b>		
	Cualitativa ordinal	<p>Valorado de 0-7 (Determinado por la capacidad funcional referida por el paciente y la exploración clínica, según escala registro CIBERER).</p> <p>1: Movilidad normal</p> <p>2: Movilidad normal, pero con calambres y fatiga</p> <p>3: Movilidad normal, pero incapaz de correr</p> <p>4: Anda con dificultad, pero es posible sin ayuda</p> <p>5: Anda con bastón</p> <p>6: Anda con muletas</p> <p>7: Silla de ruedas</p> <p>8: Encamado</p>
<b><i>Funcionalidad</i></b>		
	Cualitativa ordinal	<p>Valorado de 0-4 (Determinado por la capacidad funcional referida por el paciente y la exploración clínica, según escala registro CIBERER).</p> <p>1: Tropezos, pie caído, dedos en martillo, dificultades manipulativas</p> <p>2: Ortesis, incapaz de abotonarse, puede escribir</p>

3: Precisa de bastón, andador, cirugía de tobillo, no puede escribir  
 4: Silla de ruedas, afectación proximal  
 5: Exitus

<i>Variables neurofisiológicas</i>		
EMG realizado	Cualitativa dicotómica	Sí/No (Referido por el paciente y archivado en el registro clínico médico correspondiente).
MNCV del nervio mediano	Cualitativa ordinal	0-4 (determinado por los valores de NCV registrados en estudios electromiográficos realizados en el paciente). 0: ausencia de dato 1: normal o axonal (> 38 m/s) 2: intermedia (25-45 m/s) 3: desmielinizante (< 38 m/s)
<i>Resultados genéticos</i>		
Gen identificado	Cualitativa dicotómica	Sí/No (Determinado por los resultados de la prueba genética realizada).
PMP22 duplicación	Cualitativa dicotómica	Sí/No (Determinado por los resultados de la prueba genética realizada).
Mutación	Cualitativa discreta	Gen identificado en las pruebas/paneles genéticos.

NOTA: AD: Autosómico Dominante; AR: Autosómico Recesivo; CMT1: Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 1; EMG: Electromiograma; H: Hombre; M: Mujer; MRC: *Medical Research Council* (Consejo de Investigación Médica); m/s: metros/segundos; PMP 22: *peripheral myelin protein 22*; MNCV: *motor nerve conduction velocity*.

## 5.2. Análisis de los datos clínico-genéticos del resto de pacientes del grupo CMT1 AD y CMT1 casos esporádicos

Dentro del grupo CMT1 AD y casos esporádicos se realizó una descripción detallada de los

hallazgos clínicos y genéticos. Tras ello, se ha llevado a cabo una comparativa de nuestros datos con las series publicadas hasta el momento.

### **5.3. Identificación de nuevas mutaciones**

Una vez seleccionadas las familias con patrón CMT1 AD y esporádicos con genética no filiada, se realizó la descripción clínica, así como estudios de segregación familiar y experimentales específicos. En cada familia las técnicas realizadas han sido diferentes por lo que se exponen con detalle en cada caso.

## **6. LIMITACIONES**

Las limitaciones que podemos encontrar son fundamentalmente relacionadas con la no identificación de los pacientes por no ser derivados para estudio, por una mala codificación en el sistema informático o por ser atendidos en otros centros privados de la provincia. Al tratarse de una enfermedad genética de larga evolución y que puede ser paucisintomática, algunos casos no se sospechan y por ello no son remitidos. Esto puede derivar en un infra diagnóstico de la enfermedad y en tasas de prevalencia más bajas de las reales.

Otra de las limitaciones es la dificultad para el adecuado registro del número de familiares del caso índice realmente afectados. En ocasiones no hay contacto con el resto de la familia, solo disponemos de referencias superficiales o el resto de los individuos rechazan que se le explore y estudie para confirmar la presencia o no de la enfermedad. Esto limita una correcta definición del número real de individuos afectados en una familia y, por tanto, del patrón de herencia.

Nos encontramos con limitaciones en el plano diagnóstico derivadas de la ausencia de datos

completos en los estudios neurofisiológicos antiguos o los diferentes protocolos usados en cada caso. Además, algunos pacientes se opusieron a su realización durante el estudio. Las pruebas genéticas son costosas y el resultado de estas suele tardar meses, lo cual demora significativamente los siguientes pasos a seguir en caso de resultado negativo. Todo esto dificulta la correcta clasificación de los pacientes.

## **7. ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES**

Se ha recogido el consentimiento informado debidamente cumplimentado de cada uno de los pacientes para el uso de sus datos y, en los casos correspondientes, de sus muestras biológicas, de acuerdo con el desarrollo legal contenido en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales (BOE-A-2018-16673) que enmarca las condiciones y características de uso de la información de carácter personal para fines científicos por parte de investigadores e instituciones. El estudio ha sido aprobado por parte del Comité Ético del Hospital General Universitario de Alicante e ISABIAL (Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante).

Los datos de los pacientes del grupo CMT1A y las familias con gen no filiado estudiadas han sido introducidos en la base de datos CIBERER, firmando los consentimientos informados correspondientes y siguiendo los procesos de encriptación automática. Se han llevado a cabo las medidas necesarias con relación a la ausencia de identificadores directos de los pacientes y de los datos relacionados con la localización de estos.

Todos los procedimientos de selección y análisis de la base de datos han sido manejados según la mencionada ley.

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos se ha llevado a cabo mediante la descripción de las variables cualitativas. Solo se ha utilizado el programa para el análisis básico epidemiológico.

Se ha utilizado el paquete estadístico SPSS/PC versión 22 para Windows. Las pruebas estadísticas realizadas han incluido la descripción de las variables cuantitativas mediante el cálculo de la media y la desviación típica, y de las variables cualitativas mediante la medición de frecuencias.

Previamente, se ha comprobado que las variables cuantitativas se ajustan a la distribución normal mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para una muestra.



# RESULTADOS



## IV. RESULTADOS

### 1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Durante el período de inclusión de pacientes, entre enero de 2015 y junio de 2018, se incluyó un total de 131 pacientes correspondientes a 71 familias no relacionadas que cumplían criterios clínicos de neuropatía hereditaria (Tabla 4). De todos ellos, 19 (26.8%) casos índice fueron clasificados como desmielinizantes con un patrón autosómico dominante (CMT1-AD) en 12 (16.9%), autosómico recesivo (CMT1-AR) en 4 (5.63%), y esporádico en 3 (4.23%) casos; 18 (25.4%) fueron descritos como axonales con un patrón autosómico dominante (CMT2-AD) en 3 (4.23%), autosómico recesivo (CMT2-AR) en 1 (1.41%), y esporádico en 14 (19.7%) casos. En 5 (7.04%) familias las velocidades se mostraban en rangos intermedios. De ellas, en 4 (5.63%) casos la herencia fue ligada al X (CMTX), y el otro caso (1.41%) fue esporádico (CMTI). En 5 (7.04%) familias se identificó una delección del gen PMP22 clasificándose como HNPP.

De todos los casos índice iniciales, 24 (33.8%) fueron descartados por diferentes motivos: en 7 (9.86%) individuos se descartó la presencia de una polineuropatía por un EMG normal, en 5 (7.04%) no se pudo realizar el estudio neurofisiológico, y en 12 (16.9%) casos se llegó a otros diagnósticos.

De los 71 casos que fueron remitidos inicialmente como sospecha de neuropatía genética se llegó al diagnóstico final en 32 familias (45.1%), y concretamente en los casos con CMT confirmado en la mitad de ellas (21/42; 50%). Se excluyó de este grupo a los pacientes con diagnóstico de HNPP. La identificación del gen causante de la enfermedad se detectó en el 78.9% (15/19) de los pacientes con un patrón desmielinizante, en todos (5/5; 100%) los pacientes con unas velocidades intermedias y en uno (1/18; 5.55%) del grupo de las formas axonales. Dentro del grupo CMT1, teniendo en cuenta el tipo de herencia, el éxito diagnóstico se consiguió con mayor probabilidad en el grupo con un patrón autosómico dominante (10/12; 83.3%) frente al patrón autosómico recesivo (2/4; 50%). El resultado de un EMG

normal permitió descartar la sospecha inicial de neuropatía hereditaria y reorientar el estudio llegando al diagnóstico final de atrofia multisistema en 1 caso (1/7; 14.3%). Del mismo modo, 5 (41.7%) pacientes de los 12 con sospecha de otros diagnósticos fueron finalmente filiados.

**Tabla 4**

*Clasificación general en función de los datos electrofisiológicos y el patrón de herencia, así como porcentaje de diagnóstico genético confirmado.*

TIPO CMT	N (casos índex)	N (individuos)	% del total de la muestra	Casos índex diag.	% pacientes diag.
CMT 1 AD	12	35	16.9	10	83.3
CMT 1 AR	4	7	5.63	2	50
CMT 1 esporádico	3	3	4.23	3	100
CMT 2 AD	3	6	4.23	0	0
CMT 2 AR	1	2	1.41	0	0
CMT 2 esporádico	14	14	19.7	1	7.14
CMT X	4	25	5.63	4	100
CMT I	1	1	1.41	1	100
HNPP	5	8	7.04	5	100
EMG NORMAL	7	9	9.86	1	14.3
EMG NO REALIZADO	5	8	7.04	0	0
OTROS DIAGNÓSTICOS	12	13	16.9	5	41.7
<b>TOTAL</b>	<b>71</b>	<b>131</b>	<b>100</b>	<b>32</b>	<b>45.1</b>

NOTA: N: número. Diag.: diagnosticado.

## 2. CÁLCULO DE LA PREVALENCIA

Aunque la mayoría de los pacientes pertenecían al área de salud del Hospital General Universitario de Alicante (Departamento 19), una de las familias procedía del Hospital IMED Levante de Benidorm (sistema sanitario privado) y otra del Hospital de Elche (Departamento 20). Estos casos fueron remitidos

para segunda opinión y seguimiento y por ello incluidos en el recuento total presentado pero excluidos para el cálculo de la prevalencia.

La población asignada al Departamento 19 por el Sistema de Información Poblacional (SIP) a fecha de enero de 2018 ascendía a 273837 habitantes. De esta forma, la prevalencia mínima de Charcot-Marie-Tooth según nuestro estudio se estima en 31.8 casos/100000 habitantes en el departamento del Hospital General Universitario de Alicante.

### 3. DESCRIPCIÓN GENÉTICA GLOBAL

En los pacientes con diagnóstico genético de CMT la mutación más frecuentemente identificada fue la duplicación del gen PMP22 (47.6%). En un caso (4.76%) se identificó una mutación puntual *de novo* en PMP22 clasificada como probablemente patogénica según los análisis bioinformáticos realizados, por lo que se incluyó en el recuento final. Las mutaciones en el gen GJB1 se correspondieron con el 19.0% de los casos. En las familias de etnia gitana, las mutaciones en el gen SH3TC2 fueron las más frecuentes, siendo positivas en dos (9.52%) casos. Los genes menos habituales fueron el gen GADP1 (4.76%) y NEFL (4.76%). En una familia se identificaron dos mutaciones, una en el gen LITAF y otra EGR2, cuya presencia conjunta fue demostrada como patogénica mediante estudios funcionales (ANEXO).

En conjunto, las mutaciones para los genes PMP22 (duplicación o mutación puntual), GJB1, SH2TC3 y MPZ representaron el 85.7% de los casos diagnosticados.

No se encontraron mutaciones patogénicas en los genes AARS, ARHGEF10, DNM2, DYNC1H1, FDG4, FIG4, GARS, GADP1L1, HK1, HSPB1, HSPB8, KARS, KIFB1, LMNA, LRSAM1, MED25, MFN2, MTMR2, NDRG1, PRX, PRPS1, RAB7A, SBF2, SPTLC1, TPRV4, YARS. En algunos se identificaron variantes de significado incierto (se describe en detalle en cada caso).

**Tabla 5**

*Distribución genética de los pacientes.*

<b>GEN</b>	<b>Nº casos índice</b>	<b>%</b>
PMP22 dup	10	47.6
GJB1	4	19.0
SH3TC2	2	9.52
MPZ	1	4.76
PMP22 <i>point mut</i>	1	4.76
GADP1	1	4.76
NEFL	1	4.76
LITAF+ECG2	1	4.76

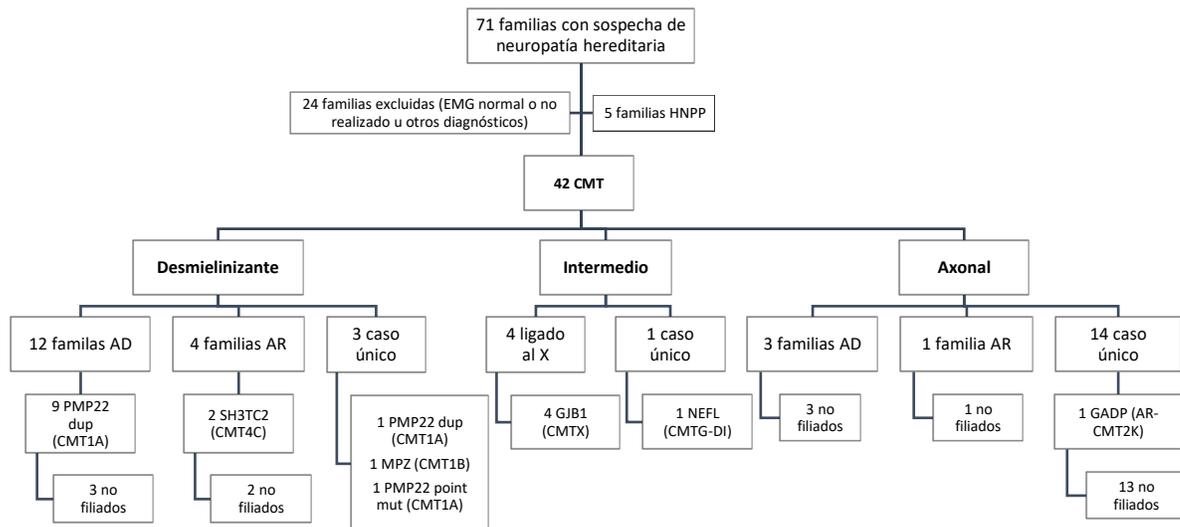
#### **4. DESCRIPCIÓN GENÉTICA POR SUBGRUPOS**

En este apartado describimos de forma detallada los genes identificados en relación a la clasificación fenotípico-genética correspondiente. En cada familia se testaron unos genes diferentes en función de la sospecha clínica y del algoritmo recomendado.

En la Figura 11 se muestra una visión general de la muestra. Se incluye la distribución de los pacientes por subgrupos y el número de individuos incluidos en cada uno de ellos. En cada subgrupo se especifican los genes con mutaciones patogénicas diagnosticados. Se describe también el número de casos sin filiar de cada subgrupo.

**Figura 11**

*Caracterización genética de los diferentes subtipos de CMT analizados durante el período de enero 2015 a junio 2018.*



#### 4.1. Charcot-Marie-Tooth tipo 1 o desmielinizante

Este fue el grupo más numeroso. Se incluyeron 19 familias, correspondientes a 45 pacientes, representando el 45.2% de todos los casos de CMT. Describimos los resultados de los análisis genéticos realizados en cada uno de los subgrupos.

- **CMT1 Autosómico Dominante**

En este grupo se incluyó a 12 familias, correspondientes a 35 pacientes afectados. En 9 familias se confirmó la duplicación del gen PMP22 (17p dup) diagnosticándose de CMT1A. En 3 familias se identificaron nuevas mutaciones consideradas no patogénicas, siendo seleccionadas para la segunda fase del estudio (Tabla 6).

En la primera de ellas (CMT1 AD-1) se realizó un análisis mediante el Panel 1 identificándose una variante *de novo* en el gen EGR2 c.1190C>A (p.Pro397His) y el polimorfismo LITAF c.146C>T (p.Thr49Met) descrito previamente como no patogénico.

La siguiente familia (CMT1 AD-2) se remitió a la Unidad de Enfermedades Neuromusculares del Hospital La Fe, donde se realizó el estudio mediante Panel 3, hallando una posible delección en el gen MME no especificada en los informes. Se describió también una variante de significado incierto en el gen ERBB4 c.3425G>A (p.Arg1142Gln). Adicionalmente, se completó el estudio a través de la empresa Sistemas Genómicos mediante un cribado de variantes en el número de copias (CNVs) por secuenciación masiva de 200 genes asociados a neuropatías, incluyendo el gen MME, sin identificar ninguna variante en el CNVs.

En la última familia (CMT1 AD-3), de etnia gitana, se solicitó el Panel 2 con resultado negativo. Se amplió el estudio con el Panel 1.1 sin identificar tampoco ninguna mutación ni variante.

**Tabla 6**

*Mutaciones y nuevas variantes de significado incierto identificadas en el grupo CMT1 AD.*

<b>FAMILIA</b>	<b>GENES</b>
CMT1A (9 familias)	PMP22 (17p dup)
CMT1 AD-1	LITAF c.146C>T, p.Thr49Met EGR2 c.1190C>A, p.Pro397His
CMT1 AD-2	ERBB4 c.3425G>A, p.Arg1142Gln MME posible delección en heterocigosis. Estudio CNVs negativo
CMT1 AD-3 (Etnia gitana)	Estudio negativo (Panel 2 y 1.1)

Las características clínicas de estos pacientes y los resultados de las pruebas genéticas se describen en detalle en el apartado correspondiente.

- **CMT1 Autosómico Recesivo o CMT4**

Dentro de este grupo se incluyeron 4 familias, correspondientes a 7 pacientes (Tabla 7).

En dos familias de etnia gitana, sin relación entre ellas, se identificó la misma mutación en el gen SH3TC2 c.3325C>T p.(Arg1109\*), correspondiente al subtipo CMT4C. En ambas se describían antecedentes de consanguinidad. En la primera de ellas, se diagnosticó a dos hermanos en homocigosis con clínica y antecedentes familiares compatibles. En la segunda familia, se encontró esta misma mutación en homocigosis en dos hermanos sintomáticos. En la madre de ambos, con algunos signos leves de polineuropatía hereditaria en la exploración, se describió la mutación en heterocigosis. En la hermana de la madre, también con síntomas leves pero estudio neurofisiológico normal, se realizó una secuenciación directa del exón 14 del gen SH3TC2, identificando la mutación en heterocigosis. No se realizó una secuenciación completa del resto del gen con el fin de descartar otras mutaciones. Solo en la tía se completó el estudio mediante MLPA del gen SH3TC2, sin identificar deleciones ni duplicaciones. Al no constatarse como casos de heterocigosis compuesta con las pruebas realizadas, la madre y la tía no fueron incluidas en el recuento total de pacientes con CMT confirmado.

**Tabla 7**

*Mutaciones y nuevas variantes de significado incierto identificadas en el grupo CMT1 AR.*

<b>FAMILIA</b>	<b>GENES</b>
CMT 4C (Etnia gitana)	SH3TC2 c.3325C>T; p.(Arg1109*)
CMT 4C (Etnia gitana)	SH3TC2 c.3325C>T; p.(Arg1109*) en homocigosis y heterocigosis
CMT1 AR-1 (Pakistán)	MTMR2 variante c.1531delC en homocigosis
CMT1 AR-2 (Etnia gitana)	Estudio negativo (PMP22)

En una familia originaria de Pakistán (CMT1 AR-1) con dos hermanos sintomáticos (padres consanguíneos) se identificó una variante de significado incierto en MTMR2 (c.1531delC) en homocigosis en la hermana de mayor edad. El hermano menor varón no ha sido confirmado genéticamente al encontrarse aún en edad pediátrica. Por el momento es considerada como posiblemente patogénica, por lo que no se incluye en la descripción genética global. Se plantea realizar estudio de segregación.

En otro paciente de etnia gitana (CMT 1 AR-2) donde se testó el gen PMP22 el resultado fue negativo.

- **CMT 1 caso único o esporádico**

De todos los pacientes con un patrón desmielinizante hubo 3 casos únicos o esporádicos en los que no constaban antecedentes familiares de neuropatía genética ni hijos afectados (Tabla 8). En todos ellos se llegó al diagnóstico genético. Un paciente fue diagnosticado de CMT1A tras confirmarse la duplicación del gen PMP22 (17p dup). Otro caso había sido estudiado previamente en la unidad de referencia de Patología Neuromuscular del Hospital La Fe de Valencia con hallazgo de una mutación en el gen MPZ correspondiente al tipo CMT1B. En otro paciente (CMT1A *point mut*) se identificó una mutación *de novo* en el gen PMP22 (pVal17\_Leu18del) probablemente patogénica. En este último caso se realizó un estudio de segregación mediante la secuenciación de la mutación en la hermana asintomática, con resultado negativo.

**Tabla 8**

*Mutaciones identificadas en el grupo CMT1 caso único o esporádico.*

<b>FAMILIA</b>	<b>GENES</b>
CMT 1A	PMP22 (17p dup)
CMT 1B	MPZ
CMT 1A <i>point mut</i>	PMP22 <i>point mutation</i> c.49_54delGTGCTG (pVal17_Leu18del)

Las características clínicas de estos pacientes y los resultados de las pruebas genéticas se describen en detalle en el apartado correspondiente.

#### 4.2. Charcot-Marie-Tooth tipo 2 o axonal

En este grupo se incluyó a 18 familias, correspondientes a un total de 22 pacientes, que representan el 42.9% de todos los casos de CMT. Describimos los resultados de los análisis genéticos realizados en cada uno de los subgrupos.

- **CMT2 Autosómico Dominante**

Se incluyó a 3 familias, con un total de 6 pacientes afectados (Tabla 9). El Panel 3 fue realizado en todos los casos. Se encontraron variantes de significado incierto en los genes ALS, TRPV4, DYNC1H1, SH3TC2 y GAN, pero ninguna de estas se consideró patogénica. Algunos genes podrían ser candidatos a estudio, pero para este trabajo no se han realizado los estudios de segregación correspondientes. En el paciente CMT2 AD-3 tanto el Panel 3 como el análisis del gen de la transtirretina (TTR) fue negativo.

**Tabla 9**

*Mutaciones y nuevas variantes de significado incierto identificadas en el grupo CMT2 AD.*

FAMILIA	GENES
CMT 2 AD-1	ALS2 .1633_1634insAAC; p.Val544_Leu545insGln <b>TRPV4</b> c.310A>G; p.M104V <b>DYNC1H1</b> c.2393G>A; p.R798Q
CMT 2 AD-2	SH3TC2 c.3689A>T; p.D1229V <b>GAN</b> c.1684C>G; p.P562A en het.
CMT 2 AD-3	Estudio negativo (Panel 3 y gen TTR)

NOTA: Los genes indicados en negrita son aquellos que se consideran candidatos a estudio sin que se haya podido demostrar su patogenicidad actualmente.

- **CMT2 Autosómico Recesivo**

Fue identificada una familia con dos pacientes afectados (Tabla 10). Al tener un origen gitano se solicitó el Panel 2. Se identificó una variante en el gen GADP1 (c.310+6delG) en heterocigosis de significado incierto con una frecuencia alélica del 0.1%.

**Tabla 10**

*Variantes de significado incierto identificada en el grupo CMT2 AR.*

FAMILIA	GENES
CMT2 AR-1 (Etnia gitana)	GADP1 c.310+6delG en heterocigosis

- **CMT2 caso único o esporádico**

Se incluyeron 14 casos únicos sin antecedentes familiares conocidos de neuropatía hereditaria (Tabla 11).

Un paciente fue diagnosticado de AR-CMT2K por mutación en GADP1 c.581C>G;p.(Ser194\*) en homocigosis. En otra paciente (CMT2-1) en el que se testaron los genes PMP22 y GADP1 se identificó la misma mutación en el gen GADP1 (c.581C>G; p.(Ser194\*)) pero en heterocigosis. Dado que esta mutación solo ha sido descrita como patogénica en homocigosis o asociada a otras mutaciones del mismo gen, no se consideró como patogénica en el segundo caso.

Se realizó el estudio mediante el Panel 3 en 7 casos. En cuatro casos (CMT2-2, 3, 4, 5) se describieron variantes de significado incierto en los genes TRPV4, ERBB4, TTN, ARHGEF10, NAGLU, PLEKHG5, KIF1A y AARS. A destacar que en los otros 3 (CMT2-6, 7, 8) el panel fue completamente negativo sin identificar ninguna variante patogénica o no. En el caso CMT2-8 se amplió el estudio testando el gen de la distrofia fascioescapulohumeral (DFSH) con resultado negativo.

**Tabla 11**

*Mutaciones y nuevas variantes de significado incierto identificadas en el grupo CMT2 caso único o esporádico.*

FAMILIA	GENES
AR-CMT2K	GADP1 c.581C>G; p.(Ser194*) en homocigosis
CMT2-1	<b>GDAP1</b> c.581C>G; p.(Ser 194*) en heterocigosis*. PMP22 negativo
CMT2-2	TRPV4 c.484T>C; p.S162P ERBB4 c.587G>A; p.R196H TTN c.96904+4T>c y c.55655G>A p.R18552H
CMT2-3	ARHGEF10 c.2993+5G>C NAGLU c.1000G>A; p.V334I
CMT2-4 (Marruecos)	<b>PLEKHG5</b> ( <i>Stop-gained</i> ). (CI139453) en heterocigosis
CMT2-5	KIF1A c.363+6A>G AARS c.2306C>G; p.S769T
CMT2-6	Estudio negativo (Panel 3)
CMT2-7	Estudio negativo (Panel 3)
CMT2-8 (País Vasco)	Estudio negativo (Panel 3 y gen DFSH)
CMT2-9	Estudio negativo (GJB1, MPZ, MFN2)
CMT2-10	Estudio negativo (PMP22, TTR)
CMT2-11 <sup>+</sup>	Estudio negativo (AGCL)
CMT2-12 <sup>+</sup> (Etnia gitana)	No estudiado
CMT2-13	No estudiado

NOTA: TTR: gen de la transtirretina (mutación p. Val30Met); AGCL: Ácidos grasos de cadena larga. Los genes indicados en negrita son aquellos que se consideran candidatos a estudio sin que se haya podido demostrar su patogenicidad actualmente. \* Esta mutación ha sido descrita como patogénica en homocigosis o en combinación con

otra mutación heterocigota en el mismo gen. + Pacientes con piramidalismo asociado en la exploración.

En el paciente CMT2-9 el estudio de los genes GJB1, MPZ, MFN2 obtuvo un resultado negativo. Los genes PMP22 y TTR fueron testados en otro individuo (CMT2-10) sin identificar mutaciones en ellos.

En dos casos se pudo objetivar piramidalismo asociado en la exploración. En uno de ellos (CMT2-11) se realizó el estudio de ácidos grasos de cadena larga siendo normal. El otro paciente (CMT2-12) no se estudió genéticamente. En este último caso el patrón de herencia fue difícil de determinar ya que su padre disponía de un electromiograma en el que se describía una polineuropatía axonal, pero en su tía el estudio demostró un patrón desmielinizante. Al no poder explorar a los familiares y al presentar nuestro paciente una clínica diferente se consideró el cuadro actual como único y se clasificó su caso como esporádico.

El último paciente (CMT2-13) no se estudió genéticamente.

#### **4.3. Charcot-Marie-Tooth con velocidades intermedias**

En este grupo se incluyó a 5 familias, correspondientes a un total de 26 pacientes, que representan el 11.9% de toda la muestra. Se describen los resultados de los análisis genéticos en cada subgrupo.

- **CMTI caso único o esporádico**

En este grupo se diagnosticó una paciente con una mutación *de novo* en el gen NEFL (c.293A>G; p.Ans98Ser) relacionada con el subtipo CMTIG. Representó el 2.38% de todos los casos de CMT de nuestra muestra.

- **CMT ligado al X**

En este grupo se incluyó a 4 familias, correspondientes a 25 pacientes, que representan el 9.52% de todos los casos de CMT. En todas las familias el gen GJB1 se encontraba mutado.

Todos los casos índice de este grupo presentaban NCV en rangos intermedios con una media de  $36,3 \pm 5,1$  m/s. Cabe destacar que en una de las familias en un individuo (hija) las velocidades se encontraban dentro del patrón axonal (45 m/s) y en otro individuo (hermano) en rango desmielinizante (26 m/s).

#### **4.4. Neuropatía Hereditaria con Hipersensibilidad a la Presión**

Se incluyó a 5 familias, con un total de 8 pacientes, todos ellos con delección en PMP22 positiva. Este grupo fue excluido del recuento total de pacientes con CMT.

#### **4.5. Grupo de pacientes con EMG normal**

De todos los pacientes remitidos como sospecha de neuropatía genética, en 7 casos el EMG fue normal o inconcluyente. En un caso se testó el gen MPZ y en otro el gen PMP22, siendo ambos negativos. Los genes para ataxia espinocerebelosa fueron negativos en otro caso cuyo diagnóstico final fue el de atrofia multisistema.

Al ser el resultado del EMG normal no se testó ningún gen en 4 casos y por el momento han quedado a expensas de evaluar progresión clínica.

#### 4.6. Grupo de pacientes con EMG no realizado

En este grupo fue especialmente difícil orientar el diagnóstico genético, dado que no se disponía del patrón de conducción electrofisiológico. En la mayor parte de los casos la no realización del EMG respondía a la negativa por parte del paciente, al tratarse de una prueba molesta. En este grupo fueron incluidos 5 casos. En un paciente (CMT no EMG-1) se estudió el gen PMP22 con resultado negativo. En otro paciente (CMT no EMG-2) se testó el gen PMP22 y además el gen GJB1, siendo ambos negativos. Se realizó el Panel 3 en un paciente (CMT no EMG-3) identificándose una variante de significado incierto en el gen MFN2 (c.1403G>A; p.Arg468His). En otros dos casos no se ha llegado a realizar ningún estudio genético.

#### 4.7. Otros diagnósticos

Entre los pacientes estudiados por sospecha de neuropatía hereditaria, hubo un total de 12 casos en los que la polineuropatía formaba parte de un proceso neurológico más amplio. Entre ellos se incluyen: Enfermedad de Fabry (1 caso), Adrenoleucomieloneuropatía (1 caso), PNP por enfermedad mitocondrial asociada a oftalmoplejía externa progresiva (1 caso), PNP por déficit de Piruvato Deshidrogenasa (1 caso), Ataxia de Friederich (1 caso), PNP sensitiva axonal (HSAN) de etiología no filiada (6 casos), PNP de fibra fina de etiología no filiada (1 caso).

#### 4.8. Casos perdidos

No se dispone de datos de evolución en un total de 7 casos. No fue posible localizar a una de las pacientes con sospecha de CMT1-AR (CMT1 AR-4). Un paciente con sospecha de CMT2 (CMT 2-4) y otro de HSAN pendientes de filiación genética no han tenido seguimiento por ser extranjeros y no ser posible

volver a contactar con ellos. Probablemente se encuentren fuera del país o hayan cambiado sus datos de contacto. En otros cuatro casos, dos con diagnóstico de CMT 2 (CMT2 AD-3 y CMT2-10), uno con diagnóstico de HSAN, y otro con EMG no realizado en nuestro centro, pero con identificación de una variante en el gen MFN2 (CMT no EMG-2), están realizando el seguimiento en el Hospital La Fe de Valencia. Estos casos se incluyen dentro de los no filiados en su subgrupo correspondiente.

## **5. DESCRIPCIÓN CLÍNICO-GENÉTICA DEL GRUPO CMT1 AUTOSÓMICO DOMINANTE Y CASOS ESPORÁDICOS**

Una vez clasificados todos los pacientes de la muestra, se seleccionó a las 12 familias diagnosticadas de Charcot-Marie-Tooth tipo 1 con patrón de herencia autosómico dominante y los 3 casos esporádicos filiados. En este apartado se lleva a cabo la descripción detallada de las familias en función de la genética identificada.

### **5.1. Charcot-Marie-Tooth tipo 1A (duplicación del gen PMP22)**

Este es el grupo más numeroso, en el que se incluyó a 10 familias, 9 con patrón AD y un caso esporádico, correspondientes a un total de 28 pacientes. Dado que no todos los familiares afectados estaban disponibles para su exploración, se ha optado por una descripción detallada del caso índice. En la Tabla 12 se incluyen las características clínicas y los resultados del estudio neurofisiológico y genético de cada uno de los pacientes incluidos.



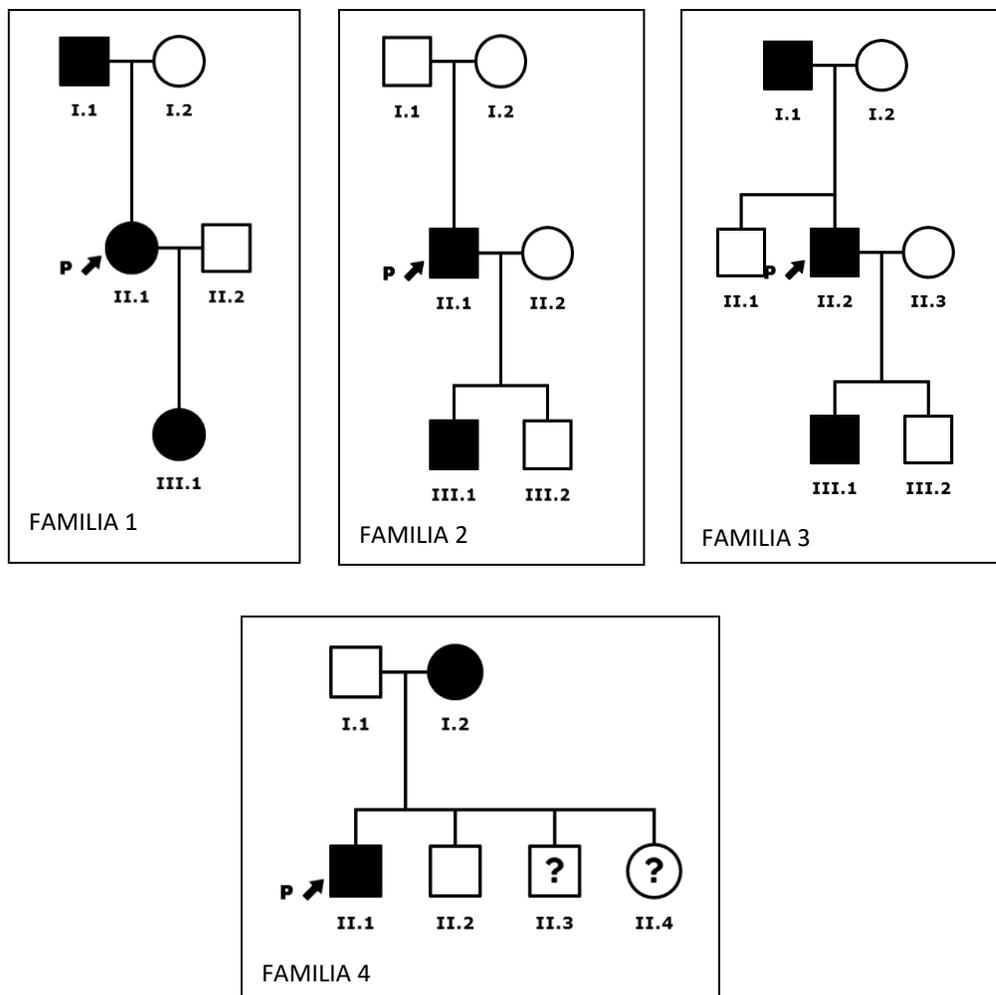


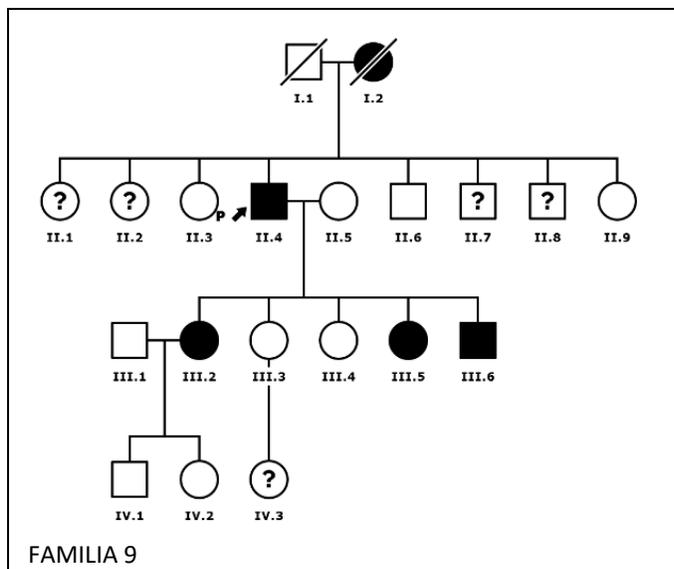
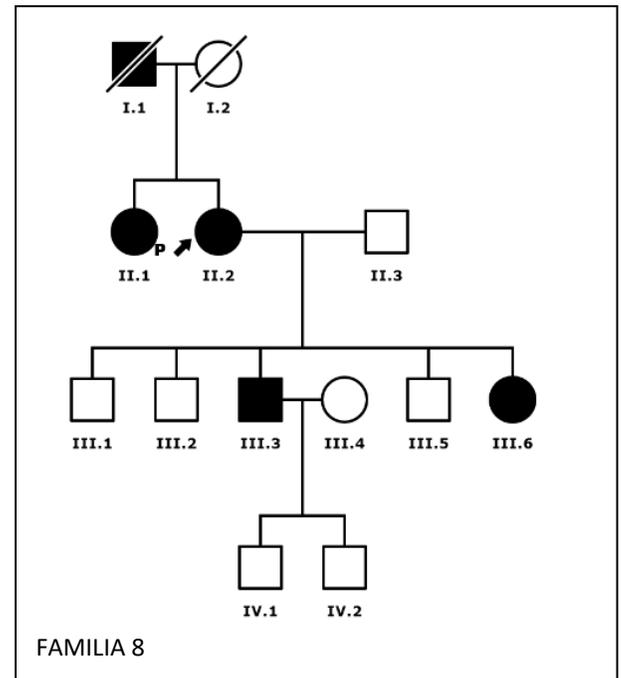
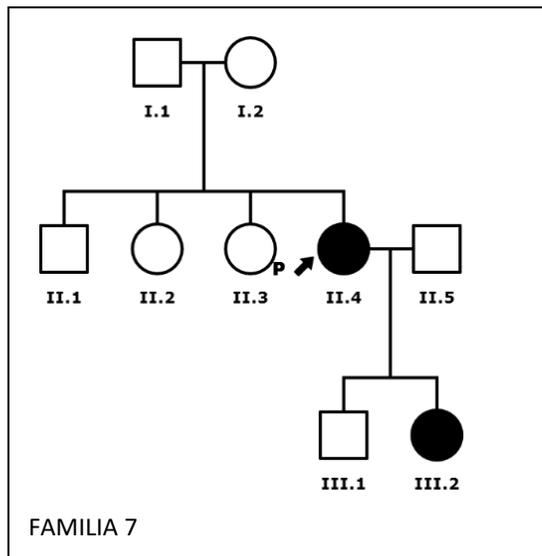
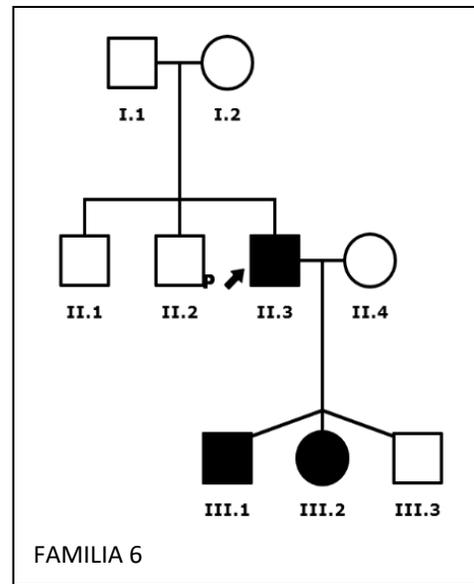
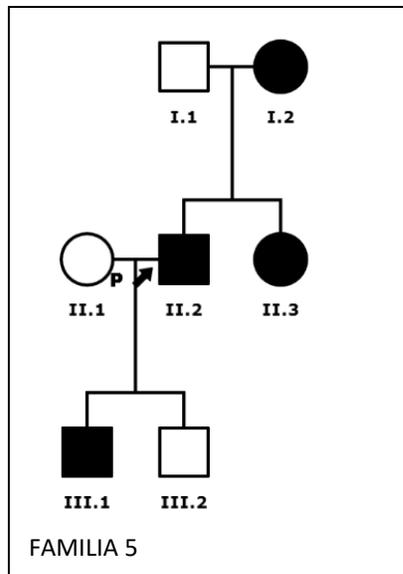
NOTA: H: hombre; M: mujer; a: años; Indet.: indeterminado; AD: Autosómico Dominante; AR: Autosómico Recesivo; *Novo*: caso esporádico o *de novo*; MMSS: miembros superiores; MMII: miembros inferiores; EMG: Electromiograma; NCV: nerve conduction velocity; PMP22: *peripheral myelin protein 22*.

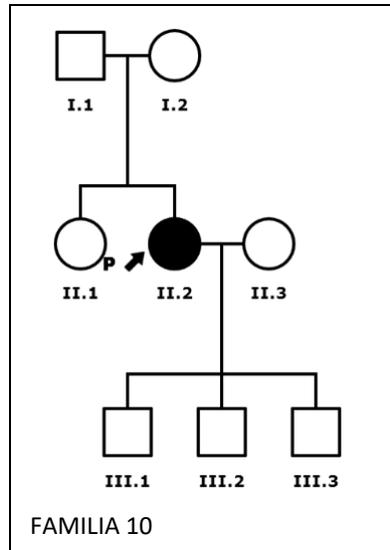
En los árboles genealógicos (Figura 12) se puede observar el patrón de herencia autosómico dominante en todas las familias, excepto un caso esporádico (Caso 10).

**Figura 12**

*Gráficos de los árboles genealógicos de las familias CMT1A incluidas en el estudio.*







NOTA: Cuadrados: hombres. Círculos: mujeres. Cuadrado y círculo tachado: fallecido/a. El caso índice aparece marcado con una flecha. Los individuos con clínica y exploración neurológica positiva a CMT son indicados en negro. Los miembros probablemente afectados pero que no fueron explorados aparecen marcados como “?”. Estos últimos y los fallecidos no fueron incluidos en el recuento total de casos afectados.

Previamente al estudio estadístico, se ha comprobado que todas las variables cuantitativas, excepto el tiempo en el retraso diagnóstico, seguían una distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk.

**Tabla 13**

*Pruebas de normalidad de las variables cuantitativas en función de las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Saphiro Wilk.*

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Edad actual	,232	10	,134	,881	10	,134
Edad de diagnóstico clínico	,163	10	,200*	,936	10	,510
Edad de diagnóstico genético	,173	10	,200*	,905	10	,251
Retraso diagnóstico	,351	10	,001	,744	10	,003
VCM del nervio cubital	,177	7	,200*	,959	7	,812

\* Esto es un límite inferior de la significación verdadera. a. Corrección de significación de Lilliefors.

### 5.1.1. Variables generales

La muestra incluía un total de 10 casos índice, con igual distribución entre hombres y mujeres (5 hombres y 5 mujeres, 50%). La edad media en el momento del estudio fue de 50.1 +/- 13.5 años (rango entre 38-78).

La mayor parte de los pacientes (60%) presentó los primeros síntomas entre los 2 y los 10 años. En un 20% aparecieron entre los 31-40 años, en 1 paciente a partir de los 40 años, y otro fue incapaz de precisar.

La edad media de diagnóstico clínico fueron los 40.6 +/- 16.4 años, y de diagnóstico genético los 47.2 +/- 11.9 años. La media de retraso diagnóstico fue de 6.2 años, con una amplia variabilidad de 6 meses a 19 años. En dos casos (caso 6 y 8) se diagnosticó en una primera visita a partir de otro familiar filiado genéticamente con anterioridad.

El número de individuos afectados en cada familia fue variable. En total se identificaron 28 casos correspondientes a 10 familias. En el 90% la herencia fue de tipo autosómico dominante. Un paciente (caso 10) fue clasificado como caso único o esporádico al no presentar antecedentes familiares de neuropatía hereditaria.

Un 30% de los casos índice presentaba comorbilidades probablemente relacionadas con la edad de los pacientes, siendo la diabetes mellitus la más frecuente (casos 8 y 10). El caso 2 estaba diagnosticado previamente de artritis reumatoide autoinmune y osteomielitis en 1<sup>er</sup> dedo del pie.

En la siguiente tabla (Tabla 14) se resumen las características generales del grupo de pacientes con diagnóstico de CMT1A.

**Tabla 14**

*Resultados descriptivos de las variables generales del grupo CMT1A.*

<b>VARIABLES GENERALES Y EPIDEMIOLOGICAS</b>	<b>N (%)</b>
<b>Total de familias estudiadas</b>	10
<b>Total de pacientes</b>	28
<b>Sexo H:M (% de mujeres)</b>	1:1 (50%)
<b>Edad actual en años (Media +/- desviación típica)</b>	50,1 +/-13,5
<b>Edad de inicio de los síntomas n (%)</b>	
Nacimiento	0 (0%)
Retraso del desarrollo motor (>18m)	0 (0%)
2-10 años	6 (60%)
11-20 años	0 (0%)
21-30 años	0 (0%)
31-40 años	2 (20%)
> 40 años	1 (10%)
Incapaz de precisar	1 (10%)
<b>Edad de diagnóstico clínico en años (Media +/- desviación típica)</b>	40,6 +/- 16,4
<b>Edad de diagnóstico genético en años (Media +/- desviación típica)</b>	47,2 +/- 11,9
<b>Media de retraso diagnóstico en años (Rango)</b>	6,2 (0-19)

NOTA: H: hombre; M: mujer.

### **5.1.2. Variables clínicas**

En lo referente a la **sintomatología motora**, en ningún paciente se observó afectación de los pares craneales, concretamente a nivel de la musculatura en territorio facial ni bulbar. De forma global, la debilidad en extremidades fue leve a moderada, de predominio distal y en miembros inferiores. Solo un 20 % de los casos presentó una debilidad leve proximal. En miembros superiores se objetivó, en un 50-60% de los casos, una paresia leve a moderada distal global, en interóseos y primer dedo. En miembros inferiores, el 80% de los pacientes presentó una debilidad <4/5 distal y un 60% una paresia del primer dedo, que incluso en el 10% de los casos llegó a ser grave. Asimismo, todos los pacientes (100%)

presentaron una arreflexia global con todos los reflejos abolidos o disminuidos. Solo en un paciente (caso 3) el reflejo bicipital estaba conservado.

Esta debilidad se asoció al patrón de **atrofia muscular** característica de estos pacientes, llamativa por su gravedad en comparación con la debilidad muscular presente. Todos los casos presentaban amiotrofia distal tanto en manos como en pies. Los músculos interóseos (100%), músculo pedio (80%) y en menor medida la eminencia tenar (60%) fueron los más afectados.

La presencia de **malformaciones** tales como los pies cavos y la retracción aquilea fueron prácticamente una constante. Solo un caso presentó pies planos (caso 2) y otro dedo en martillo (caso 5). En ningún caso se describió escoliosis o mano en garra.

Con respecto a la **sintomatología sensitiva**, todos los pacientes presentaban hipoestesia táctil y vibratoria. La sensibilidad dolorosa y propioceptiva estuvo disminuida en el 40% de los casos.

Algunos individuos asociaron al fenotipo clásico **otros síntomas**. El más frecuente fue la presencia de calambres, descrito en 6 pacientes (60%), seguido del temblor, en 4. La ataxia sensitiva se objetivó en un 40%. En 3 de estos pacientes todas las sensibilidades estaban alteradas, pero en uno de ellos no se observó hipoestesia propioceptiva ni dolorosa (caso 5). Un paciente refirió hipoacusia (caso 6) y en otro la reactividad pupilar estaba disminuida (caso 7). Los síntomas autonómicos fueron también relativamente frecuentes, apareciendo en el 50% de los casos. Se refirieron como estreñimiento, anhidrosis, disfunción eréctil, frialdad fluctuante de extremidades, hipotensión ortostática, hipersudoración y prurito en manos. En ningún caso se describió afectación cognitiva, degeneración macular, atrofia óptica, nistagmo, afectación de los oculomotores, atrofia lingual, disfonía, disartria, piramidalismo o afectación cerebelosa. Un 70% de los pacientes presentó otros síntomas como anosmia y ageusia (caso 1; 10%), mioquimias (caso 2; 10%), dificultad para iniciar el movimiento (caso 4; 10%), mareo e inestabilidad (caso 6; 10%) y dolor (casos 6, 8, 9 y 10; 40%).

La deambulaci3n era aut3noma en el 70% de los pacientes, de los cuales el 57% presentaban alguna limitaci3n. En un paciente la movilidad estaba disminuida por la presencia de calambres y fatiga, y 3 eran incapaces de correr. Un 10% de los pacientes andaba con dificultad pero sin ayuda, otro 10% precisaba de apoyo uni o bilateral y el 10% restante solo pod3a ser desplazado mediante silla de ruedas. Finalmente, esto se tradujo en una funcionalidad normal en un 30% de los casos; funcionalidad disminuida con tropiezos, pie ca3do y dificultades manipulativas en un 40%; necesidad de ortesis y dificultades a la hora de escribir y abotonarse en un 10%; bast3n, andador o cirug3a de tobillo en otro 10%; y desplazamientos con silla de ruedas y afectaci3n proximal en el 10% restante.

### **5.1.3. Variables neurofisiol3gicas y gen3ticas**

El estudio neurofisiol3gico se realiz3 en el 80% de los casos. Todos ellos presentaron unas velocidades de conducci3n motora en rango desmielinizante. La MNCV del nervio cubital media fue de 22,28 +/- 4,8 m/s. En el caso 4 y 6 no se solicit3 el electromiograma porque se dispon3a de un estudio gen3tico positivo.

En todos los casos se confirm3 la presencia de la duplicaci3n 17p del gen PMP22, bien directamente o gracias al resultado de un familiar directo (casos 6 y 8).

En la siguiente tabla (Tabla 15) se describe de forma detallada todas las variables cl3nicas y neurofisiol3gicas del grupo CMT1A.

Tabla 15

Resultados descriptivos de las variables clínicas, neurofisiológicas y genéticas del grupo CMT1A.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	N (%)
<b>BALANCE MOTOR (debilidad &lt;4)</b>	
Facial	0 (0%)
Bulbar	0 (0%)
MMSS proximal	2 (20%)
MMSS distal	6 (60%)
Interóseos	5 (50%)
Primer dedo	5 (50%)
MMII proximal	2 (20%)
MMII distal	8 (80%)
Primer dedo	6 (60%)
<b>REFLEJOS (hipo-arreflexia)</b>	
Bicipital	8 (80%)
Tricipital	9 (90%)
Estiloradial	9 (90%)
Rotuliano	9 (90%)
Aquíleo	9 (90%)
	1 caso perdido
<b>ATROFIA MUSCULAR</b>	
Interóseos	10 (100%)
Eminencia tenar	6 (60%)
MMSS distal	8 (80%)
Músculo pedio	8 (80%)
MMII distal	10 (100%)
	1 caso incompleto
<b>MALFORMACIONES</b>	
Pies cavos	10 (100%)
Retracción aquílea	9 (90%)
Mano garra	0 (0%)
Dedo martillo	1 (10%)
Escoliosis	0 (0%)
Otras	2 (20%)
<b>SENSITIVO</b>	
Hipoestesia táctil	10 (100%)
Hipoestesia vibratoria	9 (90%)
Hipoestesia dolorosa	4 (40%)
Hipoestesia propioceptiva	4 (40%)
	1 caso incompleto

<b>OTROS SÍNTOMAS</b>	
Afectación cognitiva	0 (0%)
Degeneración macular	0 (0%)
Reactividad pupilar	1 (10%)
Atrofia óptica	0 (0%)
Nistagmo	0 (0%)
Oculomotores	0 (0%)
Atrofia lingual	0 (0%)
Hipoacusia	1 (10%)
Disfonía	0 (0%)
Disartria	0 (0%)
Ataxia sensitiva	4 (40%)
Piramidalismo	0 (0%)
Cerebelo	0 (0%)
Temblor	4 (40%)
Calambres	6 (60%)
Síntomas autonómicos	5 (50%)
Otros	7 (70%)
<b>ESCALA FUNCIONAL</b>	
Movilidad normal	3 (30%)
Movilidad normal, pero con calambres y fatiga	1 (10%)
Movilidad normal, pero incapaz de correr	3 (30%)
Anda difícil, pero posible sin ayuda	1 (10%)
Anda con bastón	0 (0%)
Anda con muletas	1 (10%)
Silla de ruedas	1 (10%)
Encamado	0 (0%)
<b>FUNCIONALIDAD</b>	
Movilidad normal	3 (30%)
Tropiezos, pie caído, dedos en martillo, dificultades manipulativas	4 (40%)
Ortesis, incapaz de abotonarse, puede escribir	1 (10%)
Precisa de bastón, andador, cirugía de tobillo, no puede escribir	1 (10%)
Silla de ruedas, afectación proximal	1 (10%)
<b>EMG</b>	
MNCV del nervio cubital (Media +/- desviación típica)	22,28 +/- 4,8 1 caso incompleto y 2 perdidos
<b>PMP22 dup</b>	
	10 (100%)

NOTA: MMSS: Miembros superiores; MMII: miembros inferiores; EMG: Electromiograma; MNCV: *motor nerve conduction velocity*; PMP22: *peripheral myelin protein 22*.

#### **5.1.4. Casos perdidos**

En algunos pacientes no se pudieron completar los datos tales como la exploración de los reflejos, en el caso 9, exploración completa de la atrofia muscular, en el caso 5 y exploración completa de la sensibilidad, en el caso 1. En los casos 4 y 6 no se realizó el estudio neurofisiológico y en el caso 5 fue incompleto.

#### **5.2. Charcot-Marie-Tooth tipo 1B (mutación del gen MPZ)**

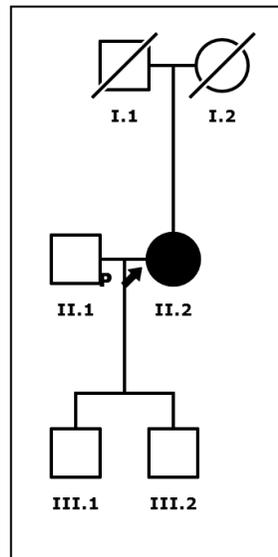
En este grupo se incluye a una familia en la que un solo miembro estaba afectado (Figura 13, II.2). Este caso fue diagnosticado en 1990 en el Hospital La Fe de Valencia como neuropatía hereditaria motora y sensitiva desmielinizante por una mutación puntual del gen MPZ correspondiente con el subtipo CMT 1B. La paciente tenía 30 años de edad. Se realizó el estudio en sus dos hijos, con resultado negativo. El seguimiento posterior se ha llevado a cabo de forma conjunta entre el Hospital La Fe y nuestro servicio.

A lo largo de su evolución se ha observado un deterioro muy significativo de la movilidad. En el momento actual la paciente presenta una tetraparesia moderada 2-3/5 proximal y grave 0-1/5 distal, con mayor destreza en la mano derecha, por lo que precisa de una silla de ruedas adaptada para todos sus desplazamientos. Se objetiva en la exploración una amiotrofia global, manos en garra y escoliosis, abolición de reflejos de forma universal e hipoestesia distal. Durante el seguimiento aparecieron otros síntomas como una diplopía binocular por paresia del recto interno del ojo derecho, nistagmo horizontal a la izquierda, paresia facial izquierda, fatiga, disnea y disartria. Fue estudiada en el Hospital La Fe descartándose la asociación de una miastenia gravis (estudio neurofisiológico y anticuerpos anti receptor de acetilcolina negativos). Se atribuyeron estos síntomas al CMT. Además, se diagnosticó un cavernoma en lóbulo frontal derecho que se mantuvo estable en los controles y episodios de irritabilidad y alteración

del lenguaje con posterior bradipsiquia, sugestivos de crisis epilépticas focales que han mejorado tras el inicio de tratamiento con levetiracetam.

**Figura 13**

*Árbol genealógico de la familia CMT1B*



NOTA: Cuadrados: hombres. Círculos: mujeres. Cuadrado y círculo tachado: fallecido. El caso índice aparece marcado con una flecha. Los individuos afectados aparecen marcados en negro.

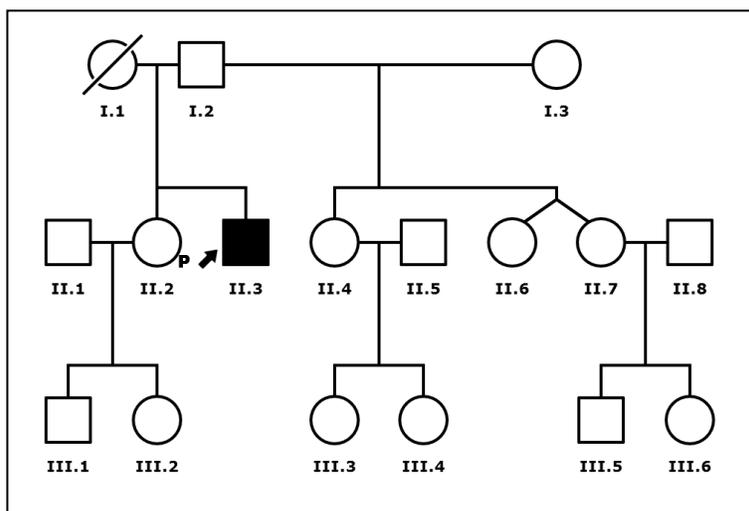
### 5.3. Charcot-Marie-Tooth tipo 1A por mutación puntual en PMP22

El paciente (Figura 14, II.3) acudió inicialmente a la consulta de neurología por una ataxia de la marcha desde la infancia. No fue capaz de andar de forma autónoma hasta la edad de 2 años y posteriormente tuvo que someterse a cirugías correctoras de pie cavo a los 8 y 14 años. La progresión del déficit motor había sido lenta. De hecho, el paciente era capaz de realizar algunos ejercicios como la natación o ciclismo, pero para andar precisaba de al menos un apoyo. Su padre (I.2) y hermana (II.2) estaban sanos; su madre (I.1) había fallecido siendo joven, pero no recordaban problemas para la marcha.

En su primera valoración en la consulta de neurología a la edad de 28 años se orientó el cuadro como una ataxia espino-cerebelosa. En la exploración el paciente presentaba una alteración del seguimiento ocular, nistagmo a la derecha, dismetría en miembros superiores, debilidad de predominio distal 4/5 en las 4 extremidades, amiotrofia distal, arreflexia global, pies cavos, retracción aquilea e hipoestesia distal moderada en miembros superiores y muy marcada en miembros inferiores, con marcha atáxica sensitiva y pie caído bilateral. En la evolución había ido empeorando y se había asociado al cuadro hipoacusia, incontinencia urinaria y frialdad cutánea. Se encontraba en seguimiento por cardiología por hipertrofia cardíaca ventricular sin alteración de la conducción nerviosa. El estudio analítico completo fue normal y la resonancia magnética no mostraba signos de atrofia cerebelosa. Se realizó un estudio electromiográfico en el que se describía una polineuropatía desmielinizante muy grave. El estudio genético de ataxia de Friederich y de ataxias espino-cerebelosas fue negativo.

**Figura 14**

*Árbol genealógico de la familia CMT1 por mutación puntual en PMP22.*



NOTA: Cuadrados: hombres. Círculos: mujeres. Cuadrado y círculo tachado: fallecido. El caso índice aparece marcado con una flecha. Los individuos con clínica positiva aparecen marcados en negro.

Dada la evolución y ante el cuadro clínico compatible con una probable neuropatía genética, se decidió ampliar el estudio con el análisis de los genes PMP22, MPZ, EGR2 y PRX identificándose una mutación *novel* en el gen PMP22 c.49\_54delGTGCTG (pVal17\_Leu18del) en heterocigosis. Tras su análisis en bases de datos y predicciones *in silico* se consideró la variante como probablemente patogénica. El estudio de segregación se realizó analizando la mutación en su hermana asintomática con resultado negativo, apoyando la probable patogenicidad de la mutación descrita en el paciente.

#### **5.4. Familia CMT1 AD-1: mutación novel en EGR2 (P397H) asociada al polimorfismo LITAF (T49M) (ANEXO)**

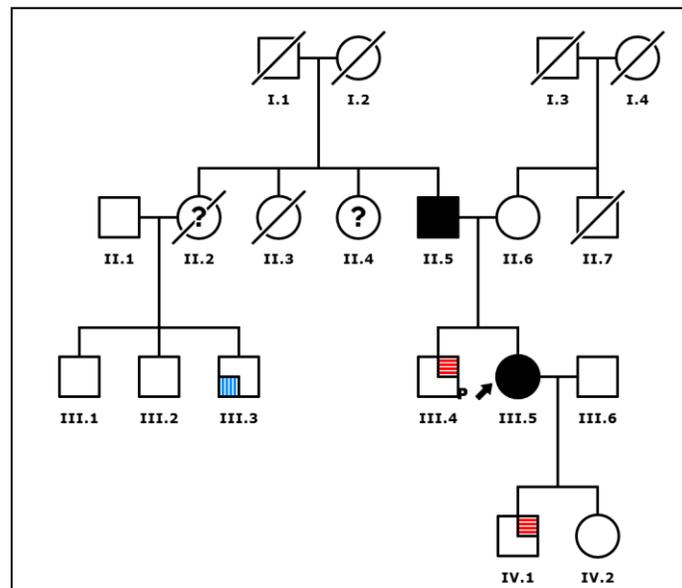
La primera paciente de esta familia que fue examinada fue una mujer de 54 años (Figura 15, III.5). Había sido diagnosticada de polineuropatía sensitivo-motora con valores de conducción con predominancia desmielinizante a la edad de 47 años. En la exploración presentaba amiotrofia distal en las 4 extremidades con debilidad asociada, hipoestesia distal, pie cavo y retracción aquilea. Se realizó un estudio genético con el Panel 1 en el cual se identificó una nueva mutación en el gen EGR2 (P397H) y el polimorfismo T49M en el gen LITAF descrito previamente como no patogénico (Beauvais *et al.*, 2006; Saifi *et al.*, 2005).

Se llevó a cabo un estudio de segregación con el resto de los familiares disponibles con el fin de determinar la mutación causal. Se realizó un examen clínico a todos ellos, un estudio EMG al padre, al hermano y al primo por parte paterna y un análisis de las mutaciones descritas en todos. El padre (II.5), que presentaba síntomas clásicos de CMT1 y un estudio EMG compatible con polineuropatía mixta crónica, era portador de la variante P397H en EGR2 en heterocigosis y también era portador del polimorfismo T49M en LITAF. Su hermano (III.6), asintomático y con EMG normal, era portador del polimorfismo T49M en LITAF en heterocigosis, pero no de la mutación en EGR2. Su hijo (IV.1),

asintomático, también era portador solo del polimorfismo en LITAF en heterocigosis. Su primo (III.3), asintomático y con estudio EMG prácticamente normal, solo portaba la variante en EGR2 P397H en heterocigosis, pero no la mutación en LITAF. Su madre (II.6) e hija (IV.2), asintomáticas, no portaban ninguna mutación.

**Figura 15**

*Árbol genealógico de la familia CMT1 AD-1.*



NOTA: Cuadrados: hombres. Círculos: mujeres. Cuadrado y círculo tachado: fallecido. El caso índice aparece marcado con una flecha. Los individuos con clínica y ambas mutaciones positivas EGR2 P397H y LITAF T49M son indicados en negro. Los individuos con la mutación EGR2 P397H positiva son indicados con un recuadro inferior azul. Los individuos con la mutación LITAF T49M positiva son indicados con un recuadro superior rojo. Los miembros probablemente afectados pero que no pudieron ser explorados aparecen marcados como “?”.

De esta forma se llegó a la conclusión de que solo los individuos que portaban ambas mutaciones desarrollaban la enfermedad. Se realizó una serie de ensayos funcionales de laboratorio para evaluar el

efecto de las mutaciones en la estructura y función de la proteína resultante y, en última instancia, en la función del nervio periférico. La descripción de estos se encuentra de forma detallada en el ANEXO de este trabajo. Describimos aquí los resultados generales.

Se decidió iniciar el estudio con el análisis del gen EGR2, ya que, aunque la mutación era novel, otras mutaciones en este gen han sido descritas en relación con CMT (Warner *et al.*, 1999). EGR2 es un factor de transcripción que contiene tres dedos de zinc capaz de activar el programa de mielinización en las células de Schwann. La mutación encontrada da lugar a un cambio en la prolina 397, un residuo muy conservado evolutivamente, que se sitúa entre dos dedos de zinc y podría ser importante para la función de este factor de transcripción.

Con el fin de determinar si la mutación alteraba la estabilidad y la localización de la expresión del polipéptido de EGR2, se insertó la mutación en el cDNA que codifica para esta proteína y se transfectó en células HEK293 y en células de Schwann. En los estudios de *Western blot* y en los de inmunofluorescencia se pudo observar que la mutación no alteraba la estabilidad de la proteína y tampoco su localización subcelular. Sin embargo, los estudios de actividad de luciferasa demostraron una clara disminución de la actividad transcripcional del EGR2 mutado al compararlo con la forma silvestre. Esto no se debía a una unión defectuosa al ADN, tal como demostraron los estudios de unión al ADN *in vitro* y los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP, del inglés *chromatin immunoprecipitation assays*).

El siguiente paso fue estudiar el gen LITAF y cómo podía influir el polimorfismo T49M en la clínica objetivada. Publicaciones previas de otros autores han postulado que el gen LITAF podría actuar como factor de transcripción (Samuel M. Lee *et al.*, 2011). Sin embargo, en nuestro estudio esto no pudo ser demostrado, ya que LITAF no fue capaz de inducir la transcripción de PMP22 y tampoco la actividad transcripcional de EGR2 en las células HEK293 que fueron transfectadas con plásmidos del gen LITAF humano no mutado. Se descartó también la posibilidad de que hubiera una interacción directa entre las

proteínas de LITAF y EGR2 mediante estudios de coimmunoprecipitación. Sin embargo, en estos últimos se observó que el péptido LITAF se expresaba menos en las células HEK293 transfectadas con la mutación, sugiriendo una pérdida en la estabilidad de la proteína. Para comprobar este efecto se realizaron estudios de *Western blot* e inmunofluorescencia en los que se transfectaron células de Schwann y células RT4D6 de Schwannoma con LITAF T49M, observando también una disminución de los niveles de expresión de la proteína comparado con las células portadoras de LITAF no mutado. Estos resultados apoyaban la idea de que una disminución en la estabilidad de la proteína era compatible con una disminución de su función.

La función de LITAF es, sin embargo, desconocida. Según algunas publicaciones se supone que interviene en el sistema de endocitosis de las células de Schwann, incluido el sistema de la neuregulina 1-erbB (NRG1-erbB) (Lee *et al.*, 2012). Las señales procedentes de este sistema promueven la expresión de determinados factores de transcripción incluyendo EGR2 (Arthur-Farraj *et al.*, 2011). Estudios previos han descrito que la disminución de la función de LITAF da lugar a una desregulación del sistema de señalización NRG1-erbB en las células de Schwann (Lee *et al.*, 2012). Por tanto, nuestra hipótesis es que, en los pacientes heterocigotos compuestos a ambas mutaciones, la reducción de la función producida por la mutación T49M en LITAF interferiría en la correcta señalización del sistema NRG1-erbB en las células de Schwann, reduciendo a su vez la expresión del gen EGR2 mutado, el cual presenta ya en sí mismo una actividad transcripcional deficiente, alterando así el desarrollo de la mielina y en última instancia la función del nervio.

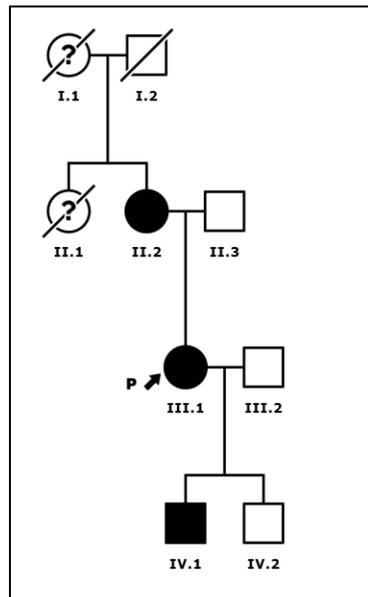
Nuestra hipótesis final no ha podido ser confirmada, ya que los estudios necesarios no han sido desarrollados debido a su complejidad y al encontrarse fuera del objetivo final de este proyecto.

### 5.5. Familia CMT1 AD-2: variantes de significado incierto

La paciente inicialmente estudiada en esta familia fue una mujer diagnosticada de polineuropatía desmielinizante crónica a la edad de 47 años (Figura 16, III.1). Los síntomas se habían iniciado unos 5 años antes en forma de sensación de acorchamiento, calambres y hormigueos a nivel distal en las 4 extremidades, sin déficit motor ni dolor neuropático asociado. Durante toda la evolución la progresión había sido escasa y los síntomas no interferían en sus actividades diarias. En la exploración neurológica se objetivó una hipoestesia distal táctil en miembros inferiores, atrofia en músculos interóseos de las manos y de la musculatura peroneal distal, arreflexia aquilea y pies cavos. La madre (II.2) y el hijo (IV.1) de la paciente fueron examinados y se pudo comprobar que presentaban síntomas y signos clínicos compatibles con una polineuropatía hereditaria. No se les realizó estudio neurofisiológico. La tía (II.1) y la abuela (I.1) de la paciente, ya fallecidas, también presentaban un fenotipo similar según los familiares.

**Figura 16**

*Árbol genealógico de la familia CMT1 AD-2*



NOTA: Cuadrados: hombres. Círculos: mujeres. Cuadrado y círculo tachado: fallecido. El caso índice aparece marcado con una flecha. Los individuos con clínica

positiva aparecen marcados en negro. Los miembros probablemente afectados pero que no pudieron ser explorados aparecen marcados como “?”.

Tras descartar causas de polineuropatía adquirida mediante un estudio analítico extenso se realizaron unos primeros análisis genéticos. Se testaron los genes PMP22, MPZ y GJB1 sin encontrar mutaciones. Se remitió a la paciente a la Unidad de Neuromuscular del Hospital La Fe, donde se realizó el estudio genético mediante el Panel 3. Como se ha descrito previamente, se identificó una probable duplicación en el gen MME en heterocigosis, sin especificarse exactamente de cuál se trataba en los informes genéticos remitidos. Para su caracterización, se realizó un estudio de cribado de CNVs mediante la secuenciación masiva de 200 genes relacionados con neuropatías, entre los cuales se encontraba MME. El resultado fue negativo, descartando la presencia de esta probable duplicación, por lo que no se realizaron más estudios en relación con este gen.

Se identificó también una mutación en el gen ERBB4 c.3425G>A (p.Arg1142Gln) no descrita previamente. Tras ello se decidió realizar un estudio de segregación incluyendo a la madre e hijo afectados y al padre e hija sanos. La mutación en el gen ERBB4 fue confirmada en la paciente y en su madre, pero no en su padre, ni en el hijo ni en la hija, por lo que se descartó como causa de la enfermedad.

### **5.6. Familia CMT1 AD-3: estudio genético negativo**

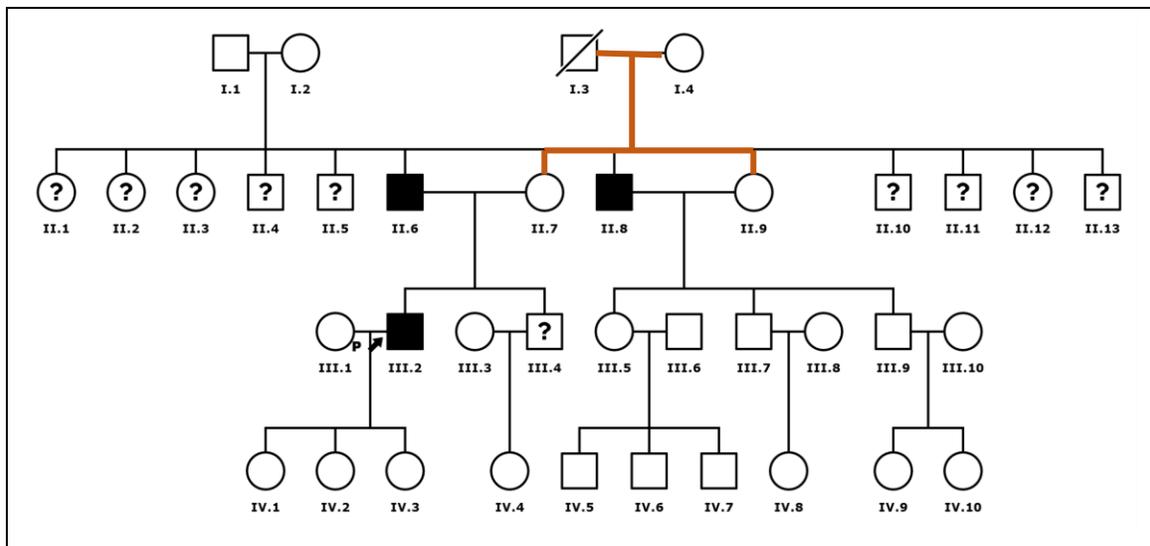
En esta familia de etnia gitana se estudiaron dos individuos por separado, el caso índice (Figura 17, III.2) y su tío paterno (II.8).

El tío del caso índice (II.8) pertenecía a una fratría de 11 hermanos. Dos de ellos, él y el padre del caso principal (II.6), presentaban claros signos de neuropatía genética, y el resto pies cavos y dificultad

para caminar. Fue valorado en la consulta de neurología a la edad de 44 años, donde refería una clínica de dolor neuropático grave crónico en los pies, torpeza al caminar y caídas de unos años de evolución sin un claro déficit motor, así como hipoacusia. En la exploración presentaba fuerza conservada en miembros superiores y leve debilidad 4+/5 en los pies, hipoestesia en miembros inferiores, arreflexia en aquíleos e hiporreflexia del resto, pies cavos y retracción aquílea. Refería episodios de depresión recurrentes desde la juventud que habían sido valorados por psiquiatría. Se realizó un estudio neurofisiológico que confirmaba la presencia de una polineuropatía sensitiva axonal leve en miembros inferiores y miembro superior derecho. El paciente presentaba antecedentes de diabetes mellitus que podían interferir en los resultados del EMG. Pero dados los antecedentes y ante la posibilidad de una neuropatía genética, se decidió ampliar el estudio mediante el Panel 2 específico de etnia gitana cuyo resultado fue negativo.

**Figura 17**

*Árbol genealógico de la familia CMT1 AD-3*



NOTA: Cuadrados: hombres. Círculos: mujeres. Cuadrado y círculo tachado: fallecido. El caso índice aparece marcado con una flecha. Los individuos con clínica positiva aparecen marcados en negro. Los miembros probablemente afectados pero que no pudieron ser explorados aparecen marcados como “?”.

Simultáneamente se estaba llevando a cabo el estudio del caso índice (III.2). Este paciente presentaba una clínica más grave. Desde la edad de 5 años se había observado una dificultad en la deambulaci3n y caídas frecuentes, a las que se ańadi3 torpeza en las manos a partir de los 12 años. Fue intervenido de labio leporino en la infancia. En la exploraci3n neurol3gica a los 25 años destacaba una importante amiotrofia generalizada, manos en garra, pies cavos y retracci3n aquilea, disfonía, debilidad distal con fuerza 3-4/5 en manos y 2/5 en pies, arreflexia e hipoestesia global en miembros inferiores. Precisaba de férulas inmovilizadoras planas en los pies y fármacos analgésicos por dolor dorsolumbar secundario a la debilidad muscular. Sus padres eran consanguíneos en segundo grado (primos segundos). Tenía un hermano con síntomas leves que no se llegó a examinar. Estaba casado con una mujer no consanguínea y sus tres hijas no presentaban síntomas, aunque se encontraban aún en edad infantil. Disponía de un estudio neurofisiológico realizado en la adolescencia donde se describía una polineuropatía sensitivo-motora crónica desmielinizante. El estudio genético inicial del gen PMP22 había sido negativo. Dado que se conocía el resultado negativo del panel genético realizado en su tío, se decidió ampliar el estudio con el Panel 1.1 con resultado también negativo. Por tanto, no se dispone de genética identificada en esta familia.



## DISCUSIÓN



## V. DISCUSIÓN

### 1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

En este estudio realizamos una selección de todos los pacientes con sospecha de neuropatía genética del área de salud correspondiente al Hospital General de Alicante entre enero de 2015 y junio de 2018, seguida de su descripción genética. De toda la muestra, nos centramos en los casos CMT1 con patrón autosómico dominante y los casos esporádicos para su análisis detallado.

Los estudios epidemiológicos en esta enfermedad son difíciles de comparar entre sí debido a las discrepancias en la metodología y a las características propias de cada población (Barreto *et al.*, 2016). La selección de los pacientes, el número de familiares explorados, los grupos incluidos y la disponibilidad del diagnóstico molecular puede llegar a ser muy diferente entre sí. El registro de estos datos varía en función de si el estudio se realiza en un centro terciario, un centro especializado de referencia o si se basa en las muestras para análisis genético remitidas (Barreto *et al.*, 2016). Por otra parte, la localización geográfica y las características socioculturales de la población pueden afectar a la homogeneidad de la muestra, influyendo así en los resultados epidemiológicos (Dubourg *et al.*, 2006; Fridman *et al.*, 2015; Lousa *et al.*, 2019). A la hora de analizar los diferentes estudios debemos tener en cuenta todos estos factores y evaluar cómo compararlos con los resultados obtenidos.

#### 1.1. Frecuencia relativa

Como se ha explicado previamente, los pacientes fueron clasificados inicialmente en función del patrón desmielinizante, axonal o intermedio y se calculó su frecuencia relativa.

En la mayoría de los estudios, la forma CMT1 es la más habitual, con una frecuencia que oscila en torno al 50-60%. De esta forma, Murphy *et al* (2012) y Foley *et al* (2012) encontraron en Inglaterra una frecuencia del 56.5% y del 51.6% de CMT1 respectivamente. En EEUU (Saporta *et al.*, 2011), Italia (Lorefice *et al.*, 2017; Manganelli *et al.*, 2014) y Alemania (Gess *et al.*, 2013; Rudnik-Schöneborn *et al.*, 2016) el resultado fue bastante similar. En algunos países la prevalencia llegó a ser incluso superior, como en Hungría, donde CMT1 se correspondió con el 77% de los casos (Milley *et al.*, 2018), y en Islandia, con el 84% (Gumundsson *et al.*, 2010). En estos estudios la prevalencia de CMT2 fue menor, oscilando desde el 12.2% al 28% de los casos, aunque debemos tener en cuenta que en algunos de ellos se incluyeron otros grupos como las formas CMTI y HNPP.

Otros autores han encontrado prevalencias prácticamente iguales entre CMT1 y CMT2 (Braathen, 2012). Sin embargo, Mattila *et al.* (2017) describió en Finlandia una mayor prevalencia del tipo CMT2, que afectaba al 66.6% de la muestra en comparación con el 19.9% de los casos CMT1, probablemente debido a una mutación fundadora en el gen GADP (Auranen *et al.*, 2013) en su forma axonal.

En nuestro país se han dado todos estos escenarios. El primer estudio publicado en Cantabria (Combarros *et al.*, 1987) describió una distribución fenotípica similar entre CMT1 (54%) y CMT2 (46%). Sin embargo, aunque en el porcentaje global con todos los pacientes incluidos predominara el tipo CMT1, el número de familias CMT2 fue mayor (11 CMT1 vs 13 CMT2). En Valencia (Sivera *et al.*, 2013) la situación fue diferente, con un predominio de la forma CMT1 correspondiente al 62.8% de la muestra, lo cual se acentuó aún más en la Isla de Gran Canaria (Lousa *et al.*, 2019) con un 78.5% de los casos afectados por CMT1 frente al 3.9% de los casos CMT2. Es probable que en este último caso se debiera a la mayor homogeneidad de la población al tratarse de una isla y a una mayor prevalencia de casos CMT1A.

En nuestra casuística, prácticamente ambos grupos presentaron la misma prevalencia, con una frecuencia de CMT1 (45.2%) y de CMT2 (42.9%) similar. Hemos de valorar que en nuestro estudio se

incluyó un grupo más, el CMTI, que representó el 11.9% de la muestra. Los estudios españoles no lo incluyeron, pero sí ha sido descrito en otras publicaciones internacionales con resultados dispares (Braathen, 2012; Foley *et al.*, 2012; Marttila *et al.*, 2017; Murphy *et al.*, 2012). Estos resultados evidencian la variabilidad en la prevalencia que puede presentar esta enfermedad en función del área geográfica que se estudie, incluso dentro de un mismo país.

Otro elemento que se valoró en nuestro proyecto a la hora de calcular la frecuencia relativa de cada grupo fue el patrón de herencia. Hasta donde se ha podido revisar la literatura, son pocos los artículos en los que se realiza esta distinción y las metodologías empleadas en su análisis son tremendamente variables. En la mayor parte de los estudios, el patrón más frecuente es el autosómico dominante, tanto en las formas desmielinizantes como axonales (Milley *et al.*, 2018; Sivera *et al.*, 2013). Sin embargo, los individuos esporádicos pueden llegar a representar hasta el 21-49% de los casos (Manganelli *et al.*, 2014; Marttila *et al.*, 2017; Milley *et al.*, 2018; Sivera *et al.*, 2013), e incluso sobrepasar en ocasiones el tipo AD (Milley *et al.*, 2018; Rudnik-Schöneborn *et al.*, 2016).

En nuestro proyecto se calculó el porcentaje de cada CMT y su tipo de herencia con respecto a toda la muestra, siendo el patrón autosómico dominante el más frecuente en las formas desmielinizantes (16.9% del total, 63.2% del grupo CMT1) tal y como se ha descrito en la mayoría de los estudios. Los casos esporádicos o únicos fueron los más frecuentes en las formas axonales (19.7% del total, 77.8% del grupo CMT2).

Al tener en cuenta únicamente los pacientes incluidos en el grupo CMT y adaptar nuestros datos a la metodología utilizada en diferentes estudios publicados, observamos un porcentaje de casos esporádicos total (40.5%) similar a los descritos por estudios realizados en Hungría (Milley *et al.*, 2018) y Alemania (Rudnik-Schöneborn *et al.*, 2016). Los casos esporádicos son realmente muy importantes porque pueden representar casos autosómicos recesivos o una mutación *de novo* que puede comportarse

como autosómica dominante. Es probable que el elevado número de casos únicos en nuestro estudio se deba a la dificultad para explorar a los familiares del caso índice, lo cual limita las posibilidades de confirmar el patrón de herencia. A esto habría que añadir la peculiaridad propia de nuestra población, con una mayor tasa de etnia gitana y de consanguinidad (Fridman *et al.*, 2015).

## 1.2. Éxito diagnóstico

A partir de la era del diagnóstico molecular y de su mayor accesibilidad en todos los hospitales, las probabilidades de filiación genética de los pacientes han aumentado considerablemente.

En una revisión realizada por la *Inherited Neuropathy Consortium* (Fridman *et al.*, 2015) en la que se incluyeron los datos de 10 centros en Estados Unidos, 1 en Inglaterra, Italia y Australia, se calculó que en un 60.4% de los casos se había llegado al diagnóstico genético, similar a los porcentajes que se habían obtenido en las series publicadas hasta el momento (Gess *et al.*, 2013; Marttila *et al.*, 2017; Milley *et al.*, 2018; Murphy *et al.*, 2012; Saporta *et al.*, 2011). El tipo CMT1 presentaba unas tasas de éxito diagnóstico superiores al resto de grupos de hasta el 91%, en comparación con el 43% del tipo CMT2. Este fenómeno se observó también en el resto de los estudios, con mayor o menor proporción entre los grupos, pero siempre con una probabilidad de diagnóstico superior en los casos CMT1 y autosómicos dominantes. Los pacientes evaluados en centros de referencia en enfermedades neuromusculares fueron los que presentaron una mayor probabilidad de diagnóstico genético (Fridman *et al.*, 2015; Murphy *et al.*, 2012; Sivera *et al.*, 2013).

El estudio realizado en Valencia presentó unas tasas de éxito bastante superiores llegando a ser del 83% (95.6% en CMT1, 62.3% en CMT2)(Sivera *et al.*, 2013). Es probable que esta alta tasa de

diagnóstico se viera incrementada al ser un centro de referencia y al uso de paneles genéticos muy completos en la mayoría de sus pacientes.

En nuestro estudio, la tasa de éxito diagnóstico genético en los pacientes con CMT confirmado clínica y electromiográficamente se calculó en el 50%, inferior a la descrita en la mayor parte de las publicaciones. Al igual que en todas las series, el grupo CMT1 fue el que presentó unas tasas superiores de diagnóstico (78.9%), sobre todo en las formas AD y en los casos esporádicos. En el grupo CMT2 el éxito fue mínimo (5.55%) ya que solo un paciente fue diagnosticado. Esto puede ser debido al alto número de casos únicos y a que en las formas axonales las tasas de éxito diagnóstico son menores. Al no ser un centro de referencia, el estudio genético fue dirigido a unos determinados genes según los algoritmos establecidos, lo cual podría disminuir la probabilidad de filiación genética. Solo se usaron paneles genéticos en un tercio de los pacientes y de forma muy seleccionada.

El grupo CMTI es raramente referenciado (Murphy *et al.*, 2012), con unas tasas de éxito diagnóstico en torno al 60%, intermedias precisamente entre CMT1 y CMT2. Sin embargo, en nuestro estudio los resultados fueron excelentes y todos los pacientes pudieron ser filiados. Es probable que esto se deba a que la mayoría de los pacientes presentaban un patrón de herencia ligado al X, lo cual fue un dato clave a la hora de orientar el estudio genético, y al uso de panel genético en el caso esporádico filiado.

En la siguiente tabla (Tabla 16) se realiza una comparativa entre nuestra muestra y diferentes estudios epidemiológicos incluyendo la distribución fenotípica y el éxito diagnóstico global.

Tabla 16

Comparativa de estudios epidemiológicos en Charcot-Marie-Tooth.

AUTOR Y AÑO	PAÍS	Nº DE PACIENTES (N familias)	DISTRIBUCIÓN FENOTÍPICA (frecuencia relativa)	ÉXITO DIAGNÓSTICO GLOBAL POR FORMAS
<i>Inherited Neuropathies Consortium</i> (Fridman <i>et al.</i> , 2015)	US, UK, Italia, Australia (Centros de referencia en Neuromuscular)	1427 pacientes	CMT1: 66.77 % CMT2: 16.6 % CMT4: 2.59 % CMT1X: 7.5 % HMN: 3.29 % HSN: 3.71 % HNPP: 2.52 %	<b>60.4 %</b> CMT1: 91.2 % CMT2: 43 %
Saporta <i>et al.</i> , 2011	US (Wayne State University, Detroit)	787 pacientes	CMT1: 55.2% CMT2: 12.2% CMT4: 0.9%	<b>67%</b> CMT1 AD: 98.2% CMT2 AD: 34.4%
Muphy <i>et al.</i> , 2012	UK Londres (Centro de referencia en Neuromuscular)	425 pacientes	CMT1: 56.5% CMT2: 27.1% CMTI: 15.6% No-clas: 1.9%	<b>62.6%</b> CMT1: 80.4% CMT2: 25.2% ICMT: 59.7%
Murphy <i>et al.</i> , 2012	UK Londres (Diagnóstico molecular)	1182 pacientes	CMT1: 37.7% CMT2: 28.3% CMTI: 0.4% No-clas: 32%	<b>37.7%</b> CMT1: 60.3% CMT2: 13.1% ICMT: 21.7% No-clas: 33.9%
Gess <i>et al.</i> , 2013	Alemania (Universidad de Muenster)	589 pacientes	CMT1: 60% CMT2: 26% HNPP: 14%	<b>58%</b> CMT1: 66% CMT2: 35% HNPP: 64%
Marttila <i>et al.</i> , 2017	Finlandia (Northern Ostrobothnia)	107 pacientes (78 familias)	CMT1: 19.9% CMT2: 66.6% CMTI: 14.14%	<b>55%</b> No especificado por formas
Milley <i>et al.</i> , 2018	Hungría	531 pacientes	CMT1: 77% CMT2: 23%	<b>59.9%</b> CMT1: 67.2% CMT2: 34.4%
Sivera <i>et al.</i> , 2013	España (Valencia) (Centro de referencia en Neuromuscular)	438 casos índice	CMT1: 62.8% CMT2: 37.2%	<b>83.3%</b> CMT1: 95.6% CMT2: 62.6%
Blanco <i>et al.</i> , 2021. (presente)	España (Alicante)	93 pacientes (42 familias)	CMT1: 45.2% CMT2: 42.9% CMTX: 9.52% CMTI: 2.38%	<b>50%</b> CMT1: 78.95% CMT2: 5.55% CMTI: 100%

NOTA: Se incluyen los datos referidos al éxito diagnóstico y a la distribución fenotípica descrita en cada estudio. Algunos datos se han adaptado para la tabla comparativa. Pueden observarse las diferencias a la hora de clasificar los grupos. No-clas: No clasificados.

Todas estas diferencias se desprenden tanto de las variaciones en la metodología utilizada, como en la heterogeneidad de la enfermedad y de las poblaciones, indicando que los estudios epidemiológicos son fundamentales con el fin de poder desarrollar estrategias específicas de diagnóstico genético.

## **2. PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD DE CMT EN EL DEPARTAMENTO DE SALUD 19**

Como sabemos, la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth es la neuropatía genética más frecuente. Numerosos estudios en diferentes países han calculado la prevalencia en su territorio, estableciendo un rango que va desde 4.9 (Davis *et al.*, 1978) a 82.3 (Braathen, 2012) casos por 100000 individuos. Esta variabilidad se explica por las diferencias metodológicas entre las publicaciones y las características geográficas y sociales de cada muestra. Los diferentes contextos genéticos, determinados por la mayor presencia de determinadas etnias y la aparición de mutaciones fundadoras, influyen en los datos totales.

Diversos estudios realizados en los países nórdicos describieron un amplio rango de prevalencias precisamente por estas razones. En Noruega (Braathen, 2012) se estimó la prevalencia más alta referida hasta la fecha con 82.3 casos por cada 100000 habitantes, mientras que en la vecina Finlandia (Marttila *et al.*, 2017) fue de 36.4. En ambos países el sistema de recogida de la información del sistema de salud es similar y geográficamente son colindantes. Pero Finlandia es un país aislado de Noruega por las diferencias lingüísticas y en este último se llevó a cabo un estudio muy meticuloso de todos los familiares del caso índice afectados de CMT. En el resto de países vecinos la prevalencia fue de 22.5 en Dinamarca

(Vaeth *et al.*, 2017), de 20.1 en Suecia (Holmberg, 1993) y de 12.0 por 100000 habitantes en Islandia (Gumundsson *et al.*, 2010).

En un estudio realizado en el norte de Inglaterra (Foley *et al.*, 2012), la prevalencia de CMT y HNPP conjuntamente fue de 11.8 por cada 100000 habitantes mientras que la de CMT solo fue de 9.8, una de las más bajas descritas en Europa.

En otros países vecinos de la cuenca mediterránea, como Chipre (Nicolaou *et al.*, 2010) e Italia (Morocutti *et al.*, 2002), las prevalencias fueron más acordes entre ellas y se describieron respectivamente en 16.0 y 17.5 por cada 100000 habitantes.

En España se han publicado dos estudios epidemiológicos al respecto. El primero de ellos fue realizado en Cantabria (Combarros *et al.*, 1987) y en él se describió una prevalencia de 28.2 por 100000 habitantes, prácticamente superponible a la reseñada recientemente en la Isla de Gran Canaria (Lousa *et al.*, 2019) de 30.0 por cada 100000 habitantes. Sin embargo, existen diferencias metodológicas importantes entre ambos estudios. El primero estaba basado en datos puramente clínicos y electrofisiológicos, por lo que se incluyeron los casos CMT1 y CMT2 sin definir el grupo HNPP y sin confirmación genética, ya que se realizó antes del descubrimiento de los primeros genes relacionados con CMT. En el estudio de las Islas Canarias se incluyeron únicamente los casos CMT1, CMT2 y HNPP clínicamente definidos y con genética filiada.

En nuestro estudio, la prevalencia se encuentra en 31.8 por 100000 habitantes, considerando solo los casos CMT. Se observa, por tanto, unas tasas de prevalencia ligeramente superiores a las descritas previamente en relación probablemente a diferencias sociales, geográficas (mayor inmigración y casos de etnia gitana) y metodológicas. Con nuestro estudio no pretendemos dar una prevalencia real extensible a todo el territorio nacional, pero sí una idea de la situación en nuestra área de salud.

**Figura 18**

*Mapa de prevalencia de los estudios epidemiológicos.*



NOTA: Mapa de prevalencia por 100000 habitantes en diferentes países de Europa. La prevalencia se calcula con respecto al número total de pacientes afectados de CMT. \*Prevalencia calculada de los casos CMT y HNPP conjuntamente.

### 3. DESCRIPCIÓN GENÉTICA GLOBAL

En el 76.2% de los casos las mutaciones causantes de la enfermedad se encontraron en los genes PMP22, MPZ y GJB1, porcentaje ligeramente inferior a lo descrito en la mayoría de las series (DiVincenzo *et al.*, 2014; Gess *et al.*, 2013; Lousa *et al.*, 2019; Murphy *et al.*, 2012; Saporta *et al.*, 2011; Sivera *et al.*, 2013). La distribución del resto de genes siguió un patrón similar al resto de estudios, con algunas peculiaridades determinadas por el área geográfica y las características de nuestra población (Tabla 17).

Siguiendo el patrón habitual, la mutación más frecuente en los casos diagnosticados fue la duplicación del gen PMP22, presente en el 47.6%, a pesar del alto número de casos CMT2 y de familias de etnia gitana. Característicamente, en el estudio de las Islas Canarias esta mutación supuso hasta un 77.3% (Lousa *et al.*, 2019), respecto a una población más homogénea y al comportarse como una mutación fundadora. La segunda mutación más frecuente fue la del gen de la conexina (Cx32) o GJB1 con una frecuencia del 19.0%, similar al resto de series.

Es interesante destacar las similitudes y diferencias con la vecina región de Valencia (Sivera *et al.*, 2013). La frecuencia de mutaciones en el gen SH3TC2 fue prácticamente la misma en ambas zonas (9.52% de Alicante frente al 7.2% de Valencia), por una mayor prevalencia de pacientes de etnia gitana que además compartían la misma mutación c.3325C>T p.(Arg1109\*). Esta fue descrita como fundadora en el área de Valencia (Claramunt *et al.*, 2007). Sin embargo, en contraste con este gen, la frecuencia de mutaciones en el gen GADP1 fue inferior (4.76% de Alicante frente al 11.1% de Valencia), probablemente por la presencia de otras mutaciones fundadoras más frecuentes y diferentes a la de nuestro paciente (Sivera *et al.*, 2017).

En las formas axonales, el gen MFN2 se ha descrito como el más habitual en numerosos estudios, con una frecuencia de hasta el 33% de todos los casos CMT2 (McCorquodale *et al.*, 2011; Verhoeven *et al.*, 2006). Sin embargo, en otras series de la costa mediterránea, la frecuencia de mutaciones en MFN2 fue realmente menor no sobrepasando el 2% (Manganelli *et al.*, 2014; Sivera *et al.*, 2013). De hecho, en nuestra cohorte no encontramos ningún paciente con mutaciones en este gen.

Las mutaciones en el gen MPZ se correspondieron con solo el 4.76% de los casos diagnosticados, similar al resto de series.

Finalmente, en solo un paciente (4.76%) se identificó una mutación rara en el gen NEFL. Habitualmente las mutaciones en este gen se corresponden con <3% de los casos de CMT (Abe *et al.*, 2009; Jordanova *et al.*, 2003).

Es destacable la familia en la que se identificaron dos mutaciones conjuntas, una en el gen LITAF y otra en EGR2. Las mutaciones en ambos genes por separado son poco frecuentes en CMT poniendo de relevancia la importancia del caso descrito y la necesidad de realizar estudios funcionales en estos casos (ANEXO).

**Tabla 17**

*Distribución genética y comparación con otras series.*

GEN	ESTUDIOS (Nº de pacientes incluidos)					
	Número de pacientes (frecuencia, %)					
	Blanco, 2021 (21)	Saporta <i>et al.</i> , 2011 (527)	Murphy <i>et al.</i> , 2012 (266) <sup>a</sup>	Gess <i>et al.</i> , 2013 (286) <sup>b</sup>	Sivera <i>et al.</i> , 2013 (375)	Lousa <i>et al.</i> , 2019 (211) <sup>c</sup>
<b>PMP22 dup</b>	10 (47.62%)	290 (55%)	168 (63.2%)	180 (62.9%)	184 (48.8%)	198 (93.8%)
<b>GJB1</b>	4 (19.05%)	80 (15.2%)	46 (17.3%)	47 (16.4%)	56 (14.9%)	2 (0.9%)
<b>SH3TC2</b>	2 (9.52%)	3 (0.6%)	5 (1.9%)	ND	27 (7.2%)	ND
<b>MPZ</b>	1 (4.76%)	45 (8.5%)	13 (4.9%)	21 (7.34 %)	19 (5.0%)	ND
<b>PMP22 point mut</b>	1 (4.76%)	5 (1.0%)	6 (2.3%)	4 (1.39%)	2 (0.5%)	3 (1.40%)
<b>GADP1</b>	1 (4.76%)	6 (1.2%)	2 (0.8%)	0 (0%)	42 (11.1%)	ND
<b>NEFL</b>	1 (4.76%)	4 (0.8%)	2 (0.8%)	0 (0%)	4 (1.1%)	ND
<b>MFN2</b>	0%	21 (4.0%)	12 (4.5%)	12 (4.19%)	6 (1.6%)	5 (2.36%)
<b>AARS</b>	0%	ND	ND	ND	ND	3 (1.42%)
<b>LITAF</b>		5 (1.0%)	4 (1.5%)	ND	ND	ND
<b>EGR2</b>	1 (4.76%)	1 (0.2%)	ND	ND	ND	ND

NOTA: ND: No descrito. PMP22 dup: PMP22 duplicación. PMP22 del: PMP22 delección. PMP22 *point mut*: PMP22 mutación puntual. Se incluyen las mutaciones más relevantes de cada uno de los estudios. \* En nuestro estudio, la mutación en LITAF y la mutación en EGR2 en el mismo paciente supuso un 4.76% de los casos totales

diagnosticados. a. Se incluyen los datos de los pacientes atendidos en la clínica de neuropatías hereditarias. b. Grupo de pacientes con diagnóstico de CMT con estudio electrofisiológico confirmatorio (adaptación de los datos) c. Se excluye el grupo de pacientes HNPP del recuento total (adaptación de los datos).

El hecho de que más del 90% de las mutaciones se localicen en los mismos genes nos hace pensar en la importancia de las guías diagnósticas en esta enfermedad. La combinación entre la semiología y los patrones de herencia, los resultados neurofisiológicos, la prevalencia y las tasas de frecuencia de cada gen en cada zona geográfica son esenciales para la creación de algoritmos diagnósticos y paneles genéticos adecuados a cada área sanitaria con el fin de evitar costes innecesarios (Saporta *et al.*, 2011).

#### 4. DESCRIPCIÓN GENÉTICA POR SUBGRUPOS

##### 4.1. Charcot – Marie- Tooth tipo 1 o desmielinizante

- **CMT1 Autosómico Dominante**

Como se ha descrito hasta ahora, las formas CMT1 autosómico dominantes fueron las más frecuentes.

La forma CMT1A, asociada a la duplicación del gen PMP22, es la más prevalente. Se corresponde con entre el 66.8 y el 80% de todos los tipos de CMT1 (Marttila *et al.*, 2017; Nelis *et al.*, 1996; Saporta *et al.*, 2011). En nuestro estudio, el 75% de todos los CMT1 AD presentaron la duplicación del gen PMP22, en consonancia con lo descrito hasta la fecha.

En este grupo se describió a otras 3 familias en las que el estudio genético inicial fue negativo. Gracias a la disponibilidad de los paneles genéticos se pudo ampliar el análisis genético, identificándose nuevas variantes en genes relacionados con CMT, pero no descritas en la literatura disponible. Siendo

este uno de nuestros objetivos, en el apartado correspondiente se realiza una descripción clínica y genética detallada de este grupo.

- **CMT1 Autosómico Recessivo o CMT4**

Las formas recesivas son más raras, aunque en determinadas áreas geográficas o etnias donde predomina la consanguinidad pueden presentarse con una frecuencia mayor (Fridman *et al.*, 2015).

El tipo CMT4C es una de las formas más frecuentes de CMT4 (hasta el 42.9% de los casos CMT4) (Saporta *et al.*, 2011) y se debe a mutaciones en el gen SH3TC2. Son múltiples las variantes patogénicas descritas en este gen en diferentes áreas geográficas y orígenes étnicos, algunas con carácter fundador. Concretamente en el área de Valencia, la mutación p.(Arg1109\*) se identificó como predominante en la población gitana (Claramunt *et al.*, 2007). Es precisamente esta mutación la presente en dos de las familias de este grupo, siendo ambas gitanas y con antecedentes de consanguinidad.

Este gen se caracteriza por una amplia variabilidad intrafamiliar, no solo en esta variante patogénica sino también en otras, pero siempre en homocigosis (Azzedine *et al.*, 2006; Colomer *et al.*, 2006). Una de las familias CMT4C presentaba unas características interesantes, ya que se identificaron individuos con un fenotipo grave portadores de la mutación p.(Arg1109\*) en homocigosis e individuos con una sintomatología más leve portadores de la misma mutación en heterocigosis. Recientemente han sido descritas dos familias clínicamente afectadas y con mutaciones en SH3TC2 en heterocigosis compuesta (Lee *et al.*, 2019). En esta familia no se pudo confirmar esta posibilidad ya que solo se secuenció el exón del gen SH3TC2 en el cual se encontraba la mutación y el estudio MLPA descartó grandes reordenamientos genéticos. Sin embargo, no se descarta completamente que se trate de un caso de heterocigosis compuesta dado que no se secuenció todo el gen u otros relacionados con CMT, por la importante historia de consanguinidad de la familia y por el hecho de que ambos casos paucisintomáticos en heterocigosis fueran, además, hermanas.

Las mutaciones en el gen MTMR2 son bastante raras (1% de los casos CMT4) y se relacionan con la forma CMT4B1. Un paciente de nuestra muestra originario de Pakistán presentó una variante c.1513delC en homocigosis no descrita hasta la fecha en las bases de datos, pero cuya predicción *in silico* sugería un cambio patogénico. Presentaba un hermano con igual sintomatología y padres consanguíneos, completamente acorde con el patrón autosómico recesivo. Sería preciso realizar un estudio de segregación en este caso para poder confirmar con seguridad la patogenicidad de la mutación encontrada.

En las formas desmielinizantes AR, el subtipo CMT4A debido a mutaciones en el gen GADP1 se corresponde con el 1-3% de los casos CMT4 (Rudnik-Schöneborn *et al.*, 2016; Zimoń *et al.*, 2015). Sin embargo, en nuestro estudio no encontramos ningún paciente con este diagnóstico.

- **CMT 1 caso único o esporádico**

Los casos esporádicos suelen ser difíciles de diagnosticar, debido a la complejidad a la hora de orientar la prueba genética que se ha de realizar y al no disponer de otros individuos con los cuales contrastar la información clínica y los hallazgos genéticos. Normalmente estos casos se estudian como si de formas autosómico dominante se trataran y, de hecho, en nuestro estudio así fue. Sin embargo, en caso de perfiles fenotípicos concretos o países en los que la consanguinidad es más frecuente se recomienda iniciar el estudio con genes concretos o de patrones recesivos.

En el Estudio colaborativo europeo (Nelis *et al.*, 1996) sobre la frecuencia de las formas CMT1 y HNPP se describió que en un 6.7% de los casos la duplicación del gen PMP22 se podía dar de forma esporádica y, a su vez, el 53.4% de los casos CMT1 esporádicos se debía a esta alteración. En estudios posteriores se llegó a describir hasta un 91.7% de los casos CMT1 esporádicos debidos a esta duplicación (Lorefice *et al.*, 2017). Los porcentajes de otros genes menos frecuentes en los casos esporádicos han sido menos estudiados y solo se describen en algunas series aisladas (Lorefice *et al.*, 2017; Manganeli *et al.*, 2014). Uno de los pacientes de nuestro estudio fue diagnosticado como CMT1A tras la identificación de

la duplicación en el gen PMP22 como *de novo*, representando el 5.2% de todos los casos CMT1 y el 33% de los CMT1 esporádicos, en línea con lo descrito previamente. Fue incluido en la descripción clínica con el resto de los casos autosómicos dominantes y por ello se describe en detalle en el apartado correspondiente.

Las mutaciones en el gen MPZ corresponden al 10% de los casos CMT1 y es poco frecuente que aparezcan como esporádicos (Manganelli *et al.*, 2014; Saporta *et al.*, 2011). Se caracterizan por una amplia variabilidad fenotípica, que se extiende desde un inicio precoz con patrón desmielinizante AD a un inicio tardío con patrón axonal AR (Shy *et al.*, 2004). En nuestra muestra, un paciente caso único fue diagnosticado de CMT1B por una mutación en el gen MPZ cuyas características clínicas se discuten más adelante.

Las mutaciones puntuales del gen PMP22 dan lugar también al fenotipo CMT1. Aunque aparecen con menos frecuencia, son más habituales en los casos esporádicos (Manganelli *et al.*, 2014). En un paciente se identificó una mutación *de novo* en el gen PMP22. Sus características genéticas y fenotípicas se abordarán en detalle junto con el resto de casos esporádicos.

#### **4.2. Charcot-Marie-Tooth tipo 2 o axonal**

- **CMT2 Autosómico Dominante**

Como se ha descrito previamente, las formas CMT2 son menos frecuentes y suelen corresponderse con el 15-30% de todos los CMT (Murphy *et al.*, 2012; Saporta *et al.*, 2011). Sin embargo, en la mayoría de los estudios no se hace una distinción entre las formas autosómicas dominantes o recesivas o se incluyen solamente las primeras, de forma que es difícil saber exactamente la proporción entre ambas. En nuestro estudio el 42.9% de todos los CMT fueron diagnosticados de CMT2. Al hacer una

distinción entre los diferentes patrones de herencia, las formas autosómicas dominantes se correspondieron con solo el 16.6% de los casos CMT2.

Las mutaciones en el gen MFN2 son la forma más común de CMT2 con patrón autosómico dominante, siendo el responsable del 10-30% de casos (4% de las formas CMT) (McCorquodale *et al.*, 2011; Murphy *et al.*, 2012; Rudnik-Schöneborn *et al.*, 2016; Saporta *et al.*, 2011; Verhoeven *et al.*, 2006). Muchas de las mutaciones en este gen son *de novo* o polimorfismos, lo cual dificulta el diagnóstico de estos pacientes. En nuestro estudio no identificamos ningún caso con mutaciones ni variantes patogénicas o no en este gen. Esto se encuentra en concordancia con otros estudios realizados en la cuenca mediterránea (Manganelli *et al.*, 2014; Sivera *et al.*, 2013), así como el realizado en Finlandia (Marttila *et al.*, 2017), donde se describió una frecuencia de este gen mucho menor (<2%) al resto de series occidentales.

En las tres familias que fueron clasificadas como CMT2 AD se realizó el estudio mediante el Panel genético 3, sin identificar en ninguna de ellas mutaciones patogénicas. Se encontraron variantes de significado incierto en genes asociados a las formas axonales de CMT2 (TPRV4, DYNC1H1), pero se precisaría de estudios de segregación familiar para confirmar la patogenicidad de estas. La mutación encontrada en el gen GAN c.1684C>G; p.P562A se ha descrito en relación a la neuropatía axonal gigante (Bruno *et al.*, 2004), una enfermedad neurodegenerativa autosómica recesiva caracterizada por un deterioro progresivo del sistema nervioso periférico y central. La clínica del paciente no era compatible y al presentarse en heterocigosis no se consideró como patogénica. En un paciente (CMT2 AD-3) el Panel 3 y el gen TTR fueron negativos, lo cual reitera la dificultad diagnóstica que encontramos en este subgrupo de pacientes.

- **CMT2 Autosómico Recessivo y caso único o esporádico**

Describimos conjuntamente ambos grupos por la peculiaridad de los resultados genéticos. En nuestro estudio solo se encontraron mutaciones significativas en el gen GADP1 y variantes de significado incierto en el resto de los genes.

Dentro de las neuropatías sensitivo-motoras hereditarias asociadas al gen GADP1 encontramos diferentes patrones: la forma autosómico recesiva desmielinizante (CMT4) (Baxter *et al.*, 2002), intermedia (RI-CMTA) (Nelis *et al.*, 2002; Senderek *et al.*, 2003) o axonal (AR-CMT2K) (Cuesta *et al.*, 2002; Birouk *et al.*, 2003) y las formas autosómico dominantes axonales (CMT2K) (Chung *et al.*, 2008; Claramunt *et al.*, 2005). Esto dificulta en muchos casos su correcta clasificación. Hemos de tener en cuenta que el factor genético que más influye en el fenotipo asociado a las mutaciones en este gen es precisamente el tipo de herencia. Las formas autosómico-dominantes suelen presentar una neuropatía de leve a moderada, con debilidad distal y pies cavos, pero con alteración tardía de la deambulación. No suelen asociar escoliosis ni disfonía. Sin embargo, las formas autosómico recesivas, aunque más homogéneas entre ellas, se caracterizan por una clínica grave y de inicio precoz (0-12 años), que requiere el uso de silla de ruedas ya en la adolescencia, con disfonía y alteración de la función respiratoria por parálisis de las cuerdas vocales y del diafragma (Sivera *et al.*, 2017). Esta variabilidad fenotípica no es exclusiva del gen GADP1 y podemos observarlo también en las mutaciones asociadas a otros genes frecuentes como MPZ y GJB1, y en otros más raros como NEFL.

Las mutaciones en el gen GADP1 se corresponden con menos del 1% de todas las formas de CMT (Murphy *et al.*, 2012; Saporta *et al.*, 2011). Sin embargo, en ciertas áreas geográficas como la cuenca mediterránea y Finlandia las mutaciones en este gen son mucho más frecuentes, llegando hasta el 31% de todos los casos de CMT (Manganelli *et al.*, 2014; Marttila *et al.*, 2017; Pezzini *et al.*, 2016; Sivera *et al.*,

2013). De hecho, en nuestro país se considera el gen GADP1 como uno de los más frecuentes en las formas CMT2, por encima incluso del gen MFN2 (Sivera *et al.*, 2013; Sivera *et al.*, 2017).

En España existe una serie de mutaciones fundadoras que explicarían este fenómeno. La mutación Q163X (c.487C>T), en su conjunto con patrón axonal AD y AR, fue descrita como la más prevalente, sobre todo en la zona del norte/noroeste. Claramunt *et al.* (2005) describieron la primera mutación en GADP1 asociada al patrón axonal autosómico dominante R120W (c.358C>T), localizada fundamentalmente en la zona mediterránea (Sivera *et al.*, 2017). A pesar de ello, en nuestra cohorte ningún paciente presentó ninguna de estas mutaciones.

La mutación S194X (c.581C>G) había sido descrita previamente en familias de España (Cuesta *et al.*, 2002), Túnez (Baxter *et al.*, 2002) y Marruecos (Azzedine *et al.*, 2003; Bouhouche *et al.*, 2007; Nelis *et al.*, 2002) confirmando un origen común en este último país. Dos pacientes de nuestra cohorte, ambos casos únicos, presentaron esta variante. El primero de ellos, en homocigosis, presentaba un patrón axonal en el estudio neurofisiológico, una clínica grave de inicio en la infancia que le obligó a usar silla de ruedas desde la adolescencia, así como una disfonía. Todo ello era compatible con el subtipo CMT2K con un perfil AR (Sevilla *et al.*, 2008). Esta mutación ha sido descrita únicamente en homocigosis (Baxter *et al.*, 2002; Birouk *et al.*, 2003; Bouhouche *et al.*, 2007) o bien asociada a otras mutaciones del mismo gen (Azzedine *et al.*, 2003; Cuesta *et al.*, 2002; Sevilla *et al.*, 2008), por lo que en el otro caso único (CMT 2-1) donde se diagnosticó en heterocigosis pura no se consideró patogénica. Sin embargo, en este último la clínica era leve a moderada, lo cual nos induce a pensar que, o bien esta mutación actúa también de una manera autosómico dominante o bien, al solo haberse testado los genes GADP1 y PMP22, presenta otra mutación en heterocigosis compuesta en otro gen no identificada por el momento.

La mutación GADP1 c.310+6delG en heterocigosis diagnosticada en la única familia de etnia gitana con un patrón autosómico recesivo axonal confirmado (CMT2 AR-1) no ha sido descrita hasta la fecha y

se ha considerado una variante de significado incierto. No se realizaron estudios de segregación que pudieran contribuir a confirmar su patogenicidad.

En otros 4 pacientes en los que se realizó el Panel genético 3 (CMT2-2, 2-3, 2-4 y 2-5) se encontraron variantes de significado incierto, que por el momento no han sido descritas ni se consideran relacionadas con la enfermedad. En uno de ellos, de origen marroquí (CMT2-4), se describió una mutación en el gen PLEKHG5 que ha sido relacionada con CMT de tipo intermedio con patrón AR (Azzedine *et al.*, 2013). Sin embargo, en nuestro paciente se encontraba en heterocigosis por lo que no se pudo establecer su patogenicidad. En el resto de los pacientes, todos los estudios realizados (Panel genético 3 y genes específicos) fueron negativos y dos pacientes no fueron estudiados, por lo que por el momento carecemos de diagnóstico genético definitivo en ellos.

Dos de estos últimos casos (CMT2-11 y CMT2-12) presentaban de forma característica hiperreflexia en la exploración. La presencia de piramidalismo en los pacientes con CMT ya había sido descrita en las primeras publicaciones (Tooth, 1886). Pero no fue hasta 1968 cuando Dyck *et al* clasificaron a este grupo de pacientes como CMT asociado a parapresia espástica (Dyck & Lambert, 1968b) y posteriormente como HMSN tipo V (Dyck *et al.*, 1975). Estos pacientes se caracterizan clínicamente por la presencia de una polineuropatía de predominio axonal con hiperreflexia, reflejo cutáneo plantar extensor y espasticidad moderada en comparación con los casos de paraparesia espástica familiar (Harding & Thomas, 1984; Neves & Kok, 2011; Vucic *et al.*, 2003). Dentro de este grupo se han descrito casos asociados a diferentes genes como EGR2 (Fusco *et al.*, 2019), GADP1 (Biancheri *et al.*, 2006), MFN2 (Zhu *et al.*, 2005), MORC2 (Albulym *et al.*, 2016) y NEFL (Hashiguchi *et al.*, 2014), aunque no todos los familiares presentaron piramidalismo en la exploración. Esto da a entender que este grupo se corresponde con un cuadro genéticamente heterogéneo, donde otros factores epigenéticos podrían determinar el fenotipo final (Biancheri *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2005). Nuestros dos casos compartían el perfil clínico asociado a este subtipo de CMT. En uno de ellos (CMT2-11) se testaron los ácidos grasos de

cadena muy larga dentro del diagnóstico diferencial de polineuropatía asociada a paraparesia espástica con resultado negativo. En ninguno de los casos se realizó un estudio genético, por lo que no se ha podido comprobar su asociación con los genes descritos hasta el momento.

La dificultad diagnóstica inherente al grupo axonal se ve influenciada también por el proceso diagnóstico. El análisis de los genes por separado mediante el método Sanger puede resultar laborioso y retrasar el proceso diagnóstico. De hecho, en los pacientes en los que se analizaron genes por separado no se encontraron mutaciones patogénicas, salvo en el gen GADP1. El estudio mediante paneles genéticos adaptados a la población en cuestión nos permite realizar un análisis simultáneo de los más frecuentes de una forma más rápida y eficaz. La ventaja no radica en el hecho de diagnosticar más genes poco frecuentes por el mero hecho de usar paneles, sino en un abordaje diagnóstico más exitoso (DiVincenzo *et al.*, 2014). No debemos olvidar algunos de sus inconvenientes, como el precio, y que en ocasiones identificamos variantes de significado incierto y difícil interpretación, como ocurre en algunos de nuestros pacientes. En estos casos, los estudios de segregación con otros familiares son fundamentales, así como las características fenotípicas compatibles con la mutación, su fisiopatología y la frecuencia de la misma en la población sana y originaria del paciente, lo cual nos permitiría diferenciarla de un polimorfismo (Rossor *et al.*, 2015).

#### **4.3. Charcot-Marie-Tooth tipo intermedio**

- **CMTI caso único o esporádico**

En nuestra muestra identificamos un paciente caso único en el cual se encontró una mutación en el gen NEFL *de novo*. Las mutaciones en este gen son poco frecuentes (<1% de todas las formas de CMT) (Fridman *et al.*, 2015) y es difícil establecer una clara correlación fenotípica dada la amplia variabilidad de mutaciones encontradas y la baja prevalencia de la enfermedad. Se han descrito mutaciones asociadas

tanto a un patrón axonal autosómico dominante (CMT2E) (Mersiyanova *et al.*, 2000b) y recesivo (Yum *et al.*, 2009), como desmielinizante autosómico dominante (CMT1F) (Jordanova *et al.*, 2003) y recesivo (Abe *et al.*, 2009). Además, recientemente se han publicado otros casos con un patrón electrofisiológico intermedio y de herencia autosómico dominante asociados a las mutaciones NEFL E396K (Berciano *et al.*, 2015) y NEFL N98S (Berciano *et al.*, 2016; Horga *et al.*, 2017; Yi Yang *et al.*, 2016).

La mutación presentada *de novo* por nuestro paciente era precisamente NEFL N98S (c.293A>G) (CMTIG). La mayoría de los casos descritos suelen ser únicos o esporádicos (Horga *et al.*, 2017). La paciente no refería antecedentes familiares de neuropatía genética y su hijo sano había sido concebido mediante fecundación *in vitro* de un óvulo donado. Presentaba un inicio precoz en la infancia, con necesidad de ortesis y silla de ruedas de forma temprana, importante afectación motora y sensitiva, ataxia cerebelosa, voz disártrica, no afectación cognitiva y NCV en rango intermedio (34m/s). La mutación NEFL N98S presenta esta serie de características fenotípicas, además de una atrofia cerebelosa y medular en resonancia magnética que no se confirmó en la paciente al no haberse realizado esta prueba (Berciano *et al.*, 2016; Yi Yang *et al.*, 2016).

- **CMT ligado al X**

En nuestra serie, el 9.52% de todos los CMT se correspondieron con el subtipo CMTX1. Todos los pacientes índice presentaban unas velocidades de conducción en rango intermedio. Sin embargo, en una de las familias pudimos observar que la hija del caso índice (varón) presentaba NCV en rango axonal mientras que un hermano las tenía en rango desmielinizante. Esta es una de las características clínicas habituales en este grupo. Como hemos señalado previamente, la discordancia en las velocidades de conducción se debería a la inactivación de uno de los cromosomas X en las células de Schwann con la mutación en GJB1, permitiendo la expresión del alelo normal dando lugar a una clínica menos grave (Siskind *et al.*, 2011).

#### 4.4. Neuropatía hereditaria con hipersensibilidad a la presión

Tal y como ocurre en nuestro proyecto, en muchos estudios epidemiológicos de CMT este grupo no se incluye ya que clínica y electrofisiológicamente presenta una serie de características particulares. En nuestra población se identificó a 5 familias, todas ellas con estudio neurofisiológico compatible y con delección en el gen PMP22. En un 60% se trataba de casos esporádicos, una frecuencia muy superior a la descrita en las series (Infante *et al.*, 2001; Rudnik-Schöneborn *et al.*, 2016). En estas familias el árbol genealógico se realizó en referencia a lo descrito por el paciente índice, sin haber sido posible la exploración de los progenitores u otros familiares. Esta puede ser una causa del alto porcentaje de casos esporádicos.

#### 4.5. Grupo de pacientes con EMG normal o no realizado

Cuando que se remite a pacientes para su estudio como sospecha de neuropatía genética hay un porcentaje de ellos que finalmente no cumple criterios de CMT. Dependiendo de si se trata de laboratorios de estudio genético, centros terciarios o de referencia y de la organización sanitaria de cada área geográfica el porcentaje es mayor o menor, sin poder establecer realmente un valor constante.

En nuestro estudio, el 9.46% de los casos presentaron un EMG normal. Esto descartó en principio que se trataran de polineuropatías hereditarias y permitió reorientar el diagnóstico. En dos casos se testaron los genes PMP22 y MPZ en función de la clínica asociada y al ser dos de los genes más frecuentes (Berciano *et al.*, 2012), pero ambos resultaron negativos. Un paciente fue diagnosticado finalmente de atrofia multisistema, una patología de difícil diagnóstico y cuyo déficit motor y de la marcha podrían haberse visto confundidos con los síntomas propios de una polineuropatía crónica (Lin *et al.*, 2014).

Los casos paucisintomáticos o que no cumplen los criterios clásicos de CMT presentan una dificultad añadida. A pesar de que se han descrito mutaciones en algunos de estos pacientes (Boerkoel *et*

*al.*, 2002), no hay estudios en los que se describa el protocolo genético diagnóstico a seguir ni la prevalencia de los genes afectados en esta población. Las recomendaciones que se aplican son las mismas que al grupo general ya que no hay suficiente evidencia para guiar adecuadamente el *screening* genético en estos casos (England *et al.*, 2009).

En un 6.76% de los casos no se disponía de estudio neurofisiológico, limitando significativamente la posibilidad de orientar el proceso de diagnóstico genético. Siguiendo el algoritmo descrito, se testaron los genes PMP22 y GJB1 con resultado negativo. Esto demuestra la baja rentabilidad de los estudios genéticos cuando no están dirigidos en función del cuadro clínico global. En otro caso se realizó directamente el Panel genético 3 en colaboración con el Servicio de Neuromuscular del Hospital La Fe de Valencia. En este caso se identificó una variante de significado incierto en el gen MFN2. Si bien es cierto que es un gen frecuente en las formas CMT2 (Verhoeven *et al.*, 2006), no pudimos confirmar su patogenicidad al no haberse realizado estudios de segregación familiar.

#### **4.6. Otros diagnósticos**

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth forma parte del espectro de las neuropatías hereditarias, en el cual se incluyen otras patologías. Comparte fenotipo y heterogeneidad genética con otros dos grandes grupos: la neuropatía hereditaria motora (HMN) y la neuropatía hereditaria sensitiva y autonómica (HSAN). Además, existen numerosas enfermedades sistémicas genéticas en las que la neuropatía forma parte del cuadro clínico tales como las ataxias espinocerebelosas hereditarias (Ataxia de Friederich), la paraplejía espástica familiar, las deficiencias de lipoproteínas (Enfermedad de Tangier, abetalipoproteinemia), las enfermedades del almacenamiento lisosomal (Enfermedad de Fabry, Enfermedad de Refsum), las leucodistrofias (Enfermedad de Krabbe, Leucodistrofia metacromática, adrenoleucodistrofia), las enfermedades mitocondriales, las porfirias, las neuroacantocitosis,

neurofibromatosis, las distrofias miotónicas y la polineuropatía amiloide familiar (Berciano *et al.*, 2012; Rossor *et al.*, 2015; Saporta *et al.*, 2014).

En nuestro estudio, 12 pacientes fueron diagnosticados de alguna de estas enfermedades. Es fundamental conocer el diagnóstico diferencial y las patologías que comparten sintomatología con CMT con el fin de llegar a una correcta filiación de los pacientes para establecer el tratamiento y el consejo genético adecuado.

## 5. DESCRIPCIÓN CLÍNICO-GENÉTICA DEL GRUPO CMT1 AUTOSÓMICO DOMINANTE Y CASOS ESPORÁDICOS

### 5.1. Charcot-Marie-Tooth tipo 1A (duplicación del gen PMP22)

#### 5.1.1. Variables generales

Todos los pacientes descritos en nuestro estudio presentaron el fenotipo “clásico” de CMT, caracterizado por una debilidad e hipoestesia distal de evolución lenta y con predominancia en miembros inferiores (Harding & Thomas, 1980a; Shy *et al.*, 2005).

Se describió el mismo número de hombres que de mujeres, mientras que la edad media de los pacientes era de unos 50 años en el momento de incluirse en el estudio (Colomban *et al.*, 2014).

La edad de inicio de los síntomas en CMT1A suele ser la primera década de vida (Bienfait *et al.*, 2006; Colomban *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 1997). De hecho, el 60% de los pacientes presentó los primeros síntomas antes de los 10 años. Sin embargo, al ser una enfermedad cuya progresión es lenta e insidiosa, en muchos casos los pacientes no llegan a consultar directamente al neurólogo. Esto da lugar a que la edad de diagnóstico se retrase a cuando la clínica empieza a ser limitante, a cuando se identifica incidentalmente al hacer un electromiograma o a cuando se diagnostica genéticamente a otro familiar afectado (Shy *et al.*, 2005). La edad media del diagnóstico en nuestro estudio fueron los 40.6 años, similar

a las series descritas previamente (Birouk *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1997). El retraso en el diagnóstico genético no ha sido valorado en los estudios publicados ya que depende del centro en el cual se realice y de los recursos de este. En nuestro centro, este período se fue acortando significativamente de forma progresiva pasando de 19 años en un caso a solo 6 meses en otro. Consideramos que fue debido a varias circunstancias. Por una parte, a una mayor disponibilidad a la hora de solicitar los estudios genéticos que previamente debían remitirse a otros hospitales. Por otra parte, a una mayor susceptibilidad a la hora de identificar estos casos en la consulta. Finalmente, al interés creciente de los pacientes derivado de un mayor acceso a la información y la búsqueda de nuevas terapias.

Como se ha descrito en estudios previos (Blair *et al.*, 1996; Nelis *et al.*, 1996), en la gran mayoría de los casos el patrón de herencia fue AD, solo un caso (10% de CMT1A, 5.6% de todos los CMT1) fue esporádico.

La presencia de comorbilidades puede empeorar el fenotipo CMT1A sin afectar necesariamente las velocidades de conducción. La diabetes mellitus fue la más frecuente, asociada al 20% de los casos. Esta patología se relaciona con un deterioro motor y de las escalas funcionales más significativo que el resto de comorbilidades, probablemente por el daño axonal asociado (Thomas *et al.*, 1997; Ursino *et al.*, 2013), una mayor pérdida de fibras mielínicas y una peor regeneración nerviosa (Chao *et al.*, 2015). Las malformaciones y la neuropatía acrodistrófica dan lugar a golpes y ulceraciones que pueden llegar a complicarse en forma de osteomielitis, empeorando el dolor y la curación de estas.

### **5.1.2. Variables clínicas**

Los pacientes presentaron una **sintomatología motora** longitud dependiente, con una mayor afectación distal y de predominio en miembros inferiores, siguiendo el patrón habitual de CMT1A (Colomban *et al.*, 2014; Shy *et al.*, 2005). En algunos casos (20%) se pudo observar una debilidad proximal,

pero en rango leve y en ningún caso más grave que la distal (Marques *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 1997). Por otro lado, la musculatura de los pares craneales, bulbar y el diafragma rara vez se ven afectados y, de hecho, ninguno de los pacientes presentaba síntomas al respecto (Thomas *et al.*, 1997). La hiporreflexia universal fue la norma, de igual manera siempre más significativa en miembros inferiores que en superiores. En casos aislados se han descrito reflejos normales (Birouk *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1997). De nuestro grupo, solo en un paciente el reflejo bicipital se encontraba conservado.

La **amiotrofia** de los músculos propios de las manos y del músculo pedio suele ser habitual en estos pacientes (Thomas *et al.*, 1997), tal y como pudo observarse en nuestra serie.

Las **malformaciones** se producen como consecuencia de la propia neuropatía que da lugar a un desequilibrio entre los músculos agonistas y antagonistas distales. Son unas de las características fenotípicas de esta enfermedad. Prácticamente todos los casos presentaron pies cavos y retracción aquilea. Sin embargo, aunque la escoliosis es también un hallazgo frecuente, ningún paciente presentó esta malformación (Birouk *et al.*, 1997; Shy *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 1997).

Las **alteraciones sensitivas** que padecen estos pacientes suelen ser la hipoestesia distal en forma de guante o calcetín, de predominio en miembros inferiores y de todas las modalidades. Los pacientes seguían este patrón en todos los casos, pero con una menor afectación de la sensibilidad dolorosa y propioceptiva a la descrita previamente (Thomas *et al.*, 1997). Los síntomas sensitivos positivos como las parestesias son, por el contrario, mucho menos frecuentes (solo un 20% de pacientes CMT1) y en nuestra serie ningún paciente los refirió (Gemignani *et al.*, 2004; Shy *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 1997).

Además del patrón fenotípico clásico, los pacientes CMT1A presentan **otros síntomas** asociados. Los calambres y las fasciculaciones fueron los más frecuentes, seguido del temblor. En las primeras descripciones éste último aparecía asociado al Síndrome de Roussy-Lévy (Roussy & Lévy, 1926; Roussy & Lévy, 1932), con las características típicas del temblor esencial. Sin embargo, posteriormente se relacionó

este síndrome con mutaciones del gen MPZ (Planté-Bordeneuve *et al.*, 1999). Algunos autores defienden que en CMT1 es probable que se deba a la neuropatía, sin alteraciones cerebelosas asociadas (Saifee *et al.*, 2015). La hipoacusia fue descrita en solo un paciente, dado que es un síntoma raro y normalmente se presenta con poca gravedad (Birouk *et al.*, 1997; Colomban *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 1997).

Los síntomas autonómicos no son frecuentes en CMT1A (Thomas *et al.*, 1997) aunque se presentaron en el 50% de los pacientes de nuestra población en forma de hipo/hiperhidrosis, alteraciones gastrointestinales, hipotensión ortostática, prurito y disfunción eréctil. Diferentes estudios (Laurà *et al.*, 2014; Nolano *et al.*, 2015; Ribiere *et al.*, 2012) han relacionado las alteraciones autonómicas, dolor neuropático y la disminución de la sensibilidad termoalgésica con una reducción clara de las fibras finas longitud dependientes en los pacientes CMT1A.

La asociación del dolor neuropático con el derivado de las malformaciones esqueléticas que producen una sobrecarga mecánica articular y fatiga muscular da lugar, de manera multifactorial, al dolor global que padecen estos pacientes (Colomban *et al.*, 2014; Pareyson & Marchesi, 2009; Thomas *et al.*, 1997). En nuestra serie, el 40% de los casos presentaban dolor en general, lo cual se encuentra en línea con lo descrito previamente (Gemignani *et al.*, 2004). Muchos pacientes referían también frialdad cutánea, sobre todo en las fases más avanzadas de la neuropatía, debida probablemente a la afectación de la fibra fina y a una menor movilidad lo cual disminuye el flujo sanguíneo y, por tanto, la temperatura cutánea.

En algunos estudios se han descrito, en menor frecuencia, otras alteraciones asociadas como el síndrome de túnel del carpo, SAOS, síntomas cerebelosos o piramidales (Birouk *et al.*, 1997; Colomban *et al.*, 2014). Sin embargo, no se dieron en ninguno de los pacientes de nuestra muestra.

La mayoría de los pacientes CMT1A se mantienen funcionales la mayor parte de su vida, y de hecho, la enfermedad no afecta a la supervivencia (Skre, 1974). Normalmente la discapacidad suele ser

leve en el 35% de los casos, siendo leve-moderada preservando autonomía en la mayoría y grave con necesidad de silla de ruedas en solo algunos casos ocasionales (Birouk *et al.*, 1997). El 70% de nuestros pacientes se mantenían independientes y con una deambulación preservada, aunque requiriendo de ayuda ortopédica en aproximadamente la mitad de ellos. Solo un caso precisaba de silla de ruedas para su actividad diaria. Aunque no se realizó un estudio comparativo como tal, se observó que las mujeres estaban más afectadas funcionalmente que los hombres (Colomban *et al.*, 2014).

### **5.1.3. Variables neurofisiológicas y genéticas**

Todos los pacientes presentaron una disminución marcada y uniforme de las velocidades de conducción tanto motoras como sensitivas. Las NCV no suelen empeorar a lo largo del seguimiento (Killian *et al.*, 1996; Shy *et al.*, 2008b; Verhamme *et al.*, 2009) y tampoco presentan diferencias en cuanto al sexo (Birouk *et al.*, 1997). Sin embargo, si observáramos un empeoramiento clínico significativo, el descenso de las velocidades de conducción se relacionaría más bien con el envejecimiento y las comorbilidades de cada individuo (Manganelli *et al.*, 2016) mientras que la progresión clínica de la neuropatía propiamente dicha se vería representada por una mayor degeneración axonal valorada mediante los CMAP (Manganelli *et al.*, 2016; Shy *et al.*, 2008b). Al no ser un estudio prospectivo, no pudimos evaluar estos datos en nuestros pacientes. Sin embargo, es importante conocer este hecho para evitar repetir pruebas innecesarias a lo largo del seguimiento clínico.

Todos los pacientes presentaban la duplicación del gen PMP22 relacionada con este fenotipo.

## 5.2. Charcot-Marie-Tooth tipo 1B (mutación del gen MPZ)

Como hemos descrito previamente, las mutaciones asociadas al gen MPZ dan lugar a tres fenotipos característicos en función de la edad de inicio de los síntomas, la gravedad clínica y las características neurofisiológicas (Callegari *et al.*, 2019; Sanmaneechai *et al.*, 2015). Aun teniendo en cuenta la variabilidad fenotípica, cada mutación en MPZ se relaciona con uno de estos fenotipos. Nuestra paciente fue diagnosticada en el Hospital La Fe de Valencia en el año 1990, cuando todavía no estaba informatizada la historia clínica. Por ello, no pudimos acceder al estudio genético realizado en este centro. La paciente también desconocía la mutación exacta en el gen MPZ de la cual era portadora. Basándonos en la descripción clínica, lo más probable es que presentara un inicio de la clínica en la forma infanto-juvenil, ya que el deterioro había sido muy significativo en la evolución y la paciente precisaba de silla de ruedas para sus desplazamientos a la edad de 55 años. Desconocemos también las velocidades de conducción del estudio neurofisiológico que nos ayudarían a confirmar el subgrupo fenotípico al cual pertenece la paciente. Se describieron como en rango desmielinizante, lo cual apoya la teoría de que la mutación dio lugar a una alteración en la mielinización más característica del grupo fenotípico de inicio precoz.

En la evolución clínica la paciente presentó una serie de síntomas oftalmológicos que hicieron sospechar la asociación de la polineuropatía hereditaria con una miastenia gravis. Hasta la fecha, solo unos casos aislados han sido publicados reportando esta asociación, siendo una condición extremadamente rara y sin una clara relación causal (Berger *et al.*, 1985; Chen *et al.*, 1997; Salemi *et al.*, 1992; Smith, 1985; Spector *et al.*, 1978). En estos casos, los estudios neurofisiológicos de fibra fina y estimulación repetitiva, así como los estudios serológicos de anticuerpos antirreceptor de acetilcolina fueron positivos. Sin embargo, en nuestra paciente no fue así y por ello se descartó finalmente esta asociación y se atribuyó la sintomatología a la propia enfermedad de CMT.

### 5.3. Charcot-Marie-Tooth tipo 1A por mutación puntual en PMP22

Las neuropatías genéticas pueden formar parte de síndromes neurológicos más extensos y complejos. A la hora de realizar la exploración neurológica, el hallazgo de síntomas aparte de los correspondientes a la neuropatía puede hacernos sospechar de otras patologías diferentes a la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. En este caso, la presencia de síntomas cerebelosos como la alteración de los movimientos oculares, el nistagmo y la dismetría orientó el diagnóstico inicialmente hacia la esfera de las ataxias. Tanto la Ataxia de Friederich como las ataxias espinocerebelosas pueden acompañarse de neuropatía axonal o desmielinizante (Harding, 1981; Manto, 2005). Sin embargo, la ausencia de atrofia cerebelosa en la resonancia magnética cerebral, así como los estudios genéticos negativos para ambas entidades permitieron descartar de forma razonable esta posibilidad. La presencia de una polineuropatía desmielinizante muy grave, junto con el inicio precoz y la predominancia de los síntomas de neuropatía genética, permitió reorientar el estudio genético. Finalmente, se identificó una mutación *inframe* en el gen PMP22 no descrita hasta la fecha.

Las mutaciones en el gen PMP22 pueden ser de tipo puntual (*missense*, *nonsense*), *inframe*, inserciones o deleciones *frameshit* (indels) o de *splicing*. Estas mutaciones dan lugar a un amplio espectro fenotípico desde las formas CMT1A a HNPP. Las mutaciones de tipo *missense* o *inframe* se han descrito relacionadas con formas de inicio precoz y grave de CMT1A (Síndrome de Déjerine-Sottas) y con la neuropatía hipomielinizante congénita tipo 1A (Russo *et al.*, 2011). Por otro lado, las mutaciones *nonsense* o *frameshift* se relacionan más frecuentemente con las formas HNPP (Karadima *et al.*, 2015; Taioli *et al.*, 2011). La mutación c.49\_54delGTGCTG (pVal17\_Leu18del) encontrada en nuestro paciente fue de tipo *inframe*, dando lugar a la pérdida de seis nucleótidos en la posición 49 del cDNA generando la pérdida de dos aminoácidos. Esta mutación no ha sido descrita hasta la fecha en las bases de datos ni se ha encontrado en la bibliografía consultada. Sin embargo, se han descrito micromutaciones similares

relacionadas con el fenotipo Déjerine-Sottas de CMT1. Koutsis *et al* (2012) describieron un caso único varón con inicio precoz y grave de una polineuropatía tipo CMT1 en el cual se identificó una micromutación *inframe de novo* (c.296\_301delCTGGAA, p.Thr99\_Gly100del) que implicaba la deleción de seis pares de bases sin cambio en el patrón de lectura, dando lugar a la pérdida de un par de aminoácidos. La similitud entre estos dos casos podría permitirnos considerar la deleción encontrada como probablemente patogénica. Además, el estudio de segregación realizado con la hermana asintomática y con resultado negativo apoya la posibilidad de que la mutación encontrada fuera la responsable de la patología del paciente.

Este caso resalta la importancia de la semiología y del conocimiento del diagnóstico diferencial de las neuropatías genéticas en toda su extensión. Y desde el punto de vista genético, subraya cómo un resultado negativo debe empujarnos a seguir investigando y replanteando el caso dentro de las posibilidades diagnósticas disponibles.

Una de las limitaciones que nos encontramos en este caso fue principalmente la dificultad de realizar un estudio de segregación más completo, ya que el probando no tenía descendencia y el resto de los familiares eran sanos. Además, no se pudieron realizar estudios experimentales que permitieran confirmar la patogenicidad de la mutación encontrada.

#### **5.4. Familia CMT1 AD-1: mutación novel en EGR2 (P397H) asociada al polimorfismo LITAF (T49M)**

##### **(ANEXO)**

EGR2 es un gen que codifica un factor de transcripción importante para los programas de mielinización de las células de Schwann (Jang *et al.*, 2006; Nagarajan *et al.*, 2001; Warner *et al.*, 1999). La mayor parte de las mutaciones descritas en este gen afecta a la región de los dedos de zinc, dando lugar a una disminución en la capacidad del factor de transcripción de unirse al ADN. La mutación P397H

encontrada en esta familia afecta a un residuo muy conservado cerca de esta región de los dedos de zinc. Mediante los estudios de actividad de la luciferasa se confirmó que la mutación disminuía la capacidad transcripcional de EGR2. Sin embargo, los estudios de unión al ADN *in vitro* y los ensayos CHIP no demostraron una alteración en la unión del factor de transcripción al ADN. Wilson *et al* (1992) describieron una mutación similar en el dedo de zinc del factor de transcripción del crecimiento nervioso del gen A (P369) que daba lugar a una disminución de su capacidad transcripcional sin alterar la capacidad de unión al ADN. Esto sugiere que estas mutaciones no interfieren únicamente en la unión al ADN, sino que podrían estar relacionadas con el reclutamiento de otras proteínas como los coactivadores.

En esta familia se encontró también el polimorfismo T49M en el gen LITAF. Esta variante ya había sido descrita previamente como no patogénica (Beauvais *et al.*, 2006; Saifi *et al.*, 2005), de hecho, en dos de los individuos de nuestra familia se encontraba presente sin relacionarse con síntomas o signos de CMT. Sorprendentemente, el individuo que presentaba solo la mutación P397H en EGR2 tampoco presentaba síntomas de CMT, por lo que esta mutación por sí sola no era responsable de la enfermedad. Solo aquellos individuos con ambas mutaciones desarrollaban síntomas.

La hipótesis inicial residía en la posibilidad de una interacción física directa entre los péptidos de ambos genes. Sin embargo, los estudios que intentaron demostrar esta relación no dieron resultados positivos. No se pudo demostrar que LITAF se uniera a EGR2 y tampoco que modificara su actividad transcripcional.

Por otro lado, sí se pudo observar una disminución en la expresión del péptido LITAF mutante en las células transfectadas sugestivo de una pérdida de función. Se sabe que la pérdida de función de LITAF está relacionada con una desregulación del sistema de señalización NRG1-erB en las células de Schwann (Lee *et al.*, 2012), el cual a su vez estimula la expresión de múltiples factores de transcripción incluido EGR2 (Arthur-Farraj *et al.*, 2011). Por tanto, es probable que la acción de cada uno por separado fuera

insuficiente para desarrollar la enfermedad, pero la presencia conjunta de ambas mutaciones desencadenara una reacción en cadena. Es decir, la pérdida de función parcial de LITAF por la mutación T49M daría lugar a una desregulación del sistema NRG1-erbB. Esto induciría de forma deficiente la expresión de EGR2 P397H, que estaría ya de por sí presente con una actividad transcripcional disminuida, interfiriendo así en el correcto desarrollo de la mielina.

### **5.5. Familia CMT1 AD-2: variantes de significado incierto**

El uso de los paneles genéticos nos ha permitido estudiar de forma rápida y eficaz a los pacientes en los que las mutaciones más frecuentes han resultado negativas. Sin embargo, los resultados que obtenemos deben interpretarse con cautela, sobre todo cuando se identifican variantes no descritas previamente y cuyo significado es realmente incierto. Además, los paneles presentan limitaciones a la hora de identificar grandes reordenamientos como duplicaciones o inserciones.

En esta familia se describieron dos mutaciones en dos genes diferentes. Tras la realización del estudio de segregación se pudo descartar razonablemente que la mutación en el gen ERBB4 estuviera relacionada con la enfermedad, ya que se encontraba presente en el caso índice y su madre sintomática pero no en el hijo sintomático.

El otro gen con resultados inciertos fue MME. En este gen se describía en el estudio mediante panel genético una probable duplicación no especificada. Las mutaciones en el gen MME han sido descritas en relación con CMT2 con herencia autosómico recesiva (Higuchi *et al.*, 2016). Posteriormente se ha ampliado su espectro a formas de inicio más tardío, incluso en la tercera edad, estableciéndose como uno de los genes más frecuentemente mutados en este subgrupo de pacientes genéticamente indeterminados (Senderek *et al.*, 2020). El cuadro clínico se caracteriza por una polineuropatía axonal de inicio tardío con un fenotipo de predominio motor, grave y de rápida evolución. En algunos pacientes los

síntomas sensitivos se manifiestan a lo largo de la enfermedad y un tercio de los pacientes presentan dolor neuropático (Higuchi *et al.*, 2016; Lupo *et al.*, 2018; Senderek *et al.*, 2020). El patrón de herencia suele ser autosómico recesivo, aunque se han descrito casos en heterocigosis. En los casos con transmisión bialélica la penetrancia es prácticamente completa y la clínica se manifiesta de forma más grave. En los pacientes portadores de variantes en heterocigosis, la transmisión se comportaría de forma autosómica dominante con una penetrancia incompleta, una clínica más leve y de inicio más tardío (Auer-Grumbach *et al.*, 2016; Senderek *et al.*, 2020). Sin embargo, se han descrito algunas familias en las que los pacientes con variantes en heterocigosis no presentan ningún síntoma (Higuchi *et al.*, 2016; Lupo *et al.*, 2018). Estas variaciones en la penetrancia de los casos heterocigotos podrían estar en relación con factores geográficos o con el efecto de las diferentes variantes sobre la funcionalidad del gen.

Basándonos en las características fenotípicas descartamos inicialmente este gen como la causa de la enfermedad en esta familia, ya que el inicio de los síntomas en el caso índice fue en la cuarta década, la clínica fue predominante sensitiva, de evolución lenta y el estudio neurofisiológico demostró NCV en rango desmielinizante. Sin embargo, teniendo en cuenta que el patrón de herencia presentaba un perfil autosómico dominante y que en los casos heterocigotos la penetrancia puede ser incompleta, se decidió ampliar el estudio mediante la realización de un cribado en el CNVs de múltiples genes, incluyendo MME. El resultado fue negativo, lo cual permitió descartar definitivamente la presencia de la probable duplicación y la relación de este gen con la patología de esta familia. No disponemos de diagnóstico genético en esta familia en el momento actual.

### **5.6. Familia CMT1 AD-3: estudio genético negativo**

Este último caso aúna varios de los conceptos que se han descrito a lo largo de este trabajo y ejemplifica la dificultad diagnóstica que presentan algunas familias.

Una de las características de la enfermedad de CMT es la heterogeneidad clínica, dentro incluso de una misma familia. De hecho, el caso índice presentaba una clínica más grave que su tío y se referían otros familiares con estigmas leves de polineuropatía genética (pies cavos, parestesias en extremidades) que no pudieron ser examinados. La familia fue clasificada como CMT1 ya que el caso índice, más joven, presentaba una polineuropatía con NCV en rango desmielinizante. Por el contrario, en su tío el estudio neurofisiológico era compatible con una polineuropatía axonal. Esto puede ser explicado por la degeneración axonal secundaria que se produce en los pacientes con patología desmielinizante crónica (Moss *et al.*, 2021), aunque en este caso era leve y de predominio en miembros inferiores.

Otro de los factores fundamentales que se tuvo en cuenta en esta familia a la hora de orientar el estudio genético fue la pertenencia a la etnia gitana. En este subgrupo de pacientes el perfil genético suele ser diferente por una mayor prevalencia de consanguinidad y orígenes geográficos concretos. A pesar de que se realizó un panel genético completo para etnia gitana en el tío y otro panel dirigido a la población general en el caso índice, no se llegó al diagnóstico genético en esta familia.

Por último, cabe resaltar la importancia de los nuevos métodos diagnósticos. Gracias al uso de paneles genéticos se pudieron analizar múltiples genes de forma simultánea. La interpretación de los datos se realizó siguiendo las directrices de la *American College of Medical Genetics and Genomics* sin poder clasificar ninguna de las variantes encontradas como probablemente patogénica en el momento actual. Sin embargo, el hecho de tener almacenada esta información nos puede permitir volver a analizar los resultados en el futuro, en caso de describirse nuevas variantes asociadas a CMT. En esta familia se plantea continuar el estudio mediante la realización de la secuenciación completa de los exones.



# CONCLUSIONES



## VI. CONCLUSIONES

1. Las diferencias metodológicas en los trabajos publicados y las características demográficas y socioculturales de cada población determinan la comparación de los estudios epidemiológicos en CMT. En nuestra población, la distribución entre los grupos CMT1 y CMT2 fue similar, incluyendo un tercer grupo CMTI que representó el 11.9% de la muestra. Los casos autosómicos dominantes fueron los más frecuentes en las formas desmielinizantes, y los casos esporádicos en las formas axonales.

2. Las probabilidades de éxito diagnóstico están determinadas por el subtipo de CMT y los recursos de cada centro. Se consiguió el diagnóstico genético en la mitad de los pacientes de la muestra, sobre todo en las formas CMT1 AD. El uso de algoritmos diagnósticos y de paneles genéticos permitió aumentar gradualmente las posibilidades de diagnóstico genético en nuestros pacientes.

3. La prevalencia de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth en el Departamento de Salud de Alicante es de 31.8 casos por 100000 habitantes, en concordancia con otros estudios epidemiológicos realizados en otras áreas geográficas de nuestro país.

4. Las mutaciones en los genes PMP22, GJB1 y MPZ fueron las más frecuentes, tal y como se ha descrito en la literatura actual. La presencia de varias familias con mutaciones en el gen SH3TC2 se explica por las características demográficas de nuestra región, tales como la alta prevalencia de etnia gitana y la consanguinidad.

5. La distribución genética por subgrupos siguió los patrones habituales descritos hasta el momento, con una mayor prevalencia de casos con duplicación del gen PMP22 en CMT1, mutaciones en el gen GADP1 en CMT2, y mutaciones en el gen GJB1 en el grupo CMTI. La imposibilidad para explorar a los familiares de los casos índice de CMT2 y la dificultad de

diagnóstico genético inherente de este grupo explicaría el alto porcentaje de pacientes sin etiología genética filiada.

6. Los pacientes diagnosticados de CMT1A presentaron las características clínicas clásicas de esta enfermedad, caracterizada por una debilidad e hipoestesia distal en extremidades, malformaciones óseas y progresión lenta. Característicamente, un 50% de los pacientes presentaba síntomas autonómicos y un 40% dolor generalizado. Aunque la mayoría de los pacientes inició la sintomatología en la primera década de vida, el 70% mantenía una buena funcionalidad con deambulación preservada, requiriendo de ayuda ortopédica en algunos casos.

7. Se incluyó un caso CMT1B por mutación en el gen MPZ, probablemente relacionada con el subtipo infanto-juvenil. La asociación de miastenia gravis con CMT es muy infrecuente y no presenta una clara relación causal.

8. Las mutaciones puntuales en el gen PMP22 se relacionan con formas graves y de inicio precoz de CMT1, tal y como se describe en nuestro paciente. Es imprescindible conocer el diagnóstico diferencial de CMT con otras patologías para evitar errores y retrasos diagnósticos.

9. El uso de paneles genéticos nos permite analizar múltiples genes de forma simultánea. Los estudios de segregación familiar son fundamentales para determinar la patogenicidad de las variantes encontradas. La identificación de dos mutaciones en dos genes diferentes relacionados con CMT1 en forma de heterocigosis compuesta se postula como una nueva causa de enfermedad. En la familia descrita todos estos procesos permitieron llevar a cabo un estudio experimental que demostró la patogenicidad de ambas variantes en LITAF y EGR2 únicamente en los casos de heterocigosis compuesta. La colaboración entre la parte clínica del proceso y la investigación básica fue fundamental para confirmar estos hallazgos y así ampliar el conocimiento de las bases fisiopatológicas de esta enfermedad.

10. A pesar de todos los avances diagnósticos disponibles en la práctica clínica diaria, aún quedan familias cuya etiología genética queda sin filiar. Bien porque las variantes encontradas no se correlacionan con el fenotipo o bien porque no se encuentran variables que puedan ser consideradas como patogénicas con la información disponible actualmente. Esto demuestra la gran heterogeneidad clínica y genética de esta enfermedad y la necesidad de continuar ampliando el conocimiento y profundizando en las líneas de investigación.



## REFERENCIAS



## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, A., Numakura, C., Saito, K., Koide, H., Oka, N., Honma, A., Kishikawa, Y., & Hayasaka, K. (2009). Neurofilament light chain polypeptide gene mutations in Charcot–Marie–Tooth disease: nonsense mutation probably causes a recessive phenotype. *Journal of Human Genetics*, *54*(2), 94–97. <https://doi.org/10.1038/jhg.2008.13>
- Albulym, O. M., Kennerson, M. L., Harms, M. B., Drew, A. P., Siddell, A. H., Auer-Grumbach, M., Pestronk, A., Connolly, A., Baloh, R. H., Zuchner, S., Reddel, S. W., & Nicholson, G. A. (2016). MORC2 mutations cause axonal Charcot-Marie-Tooth disease with pyramidal signs. *Annals of Neurology*, *79*(3), 419–427. <https://doi.org/10.1002/ana.24575>
- Andersson, P. B., Yuen, E., Parko, K., & So, Y. T. (2000). Electrodiagnostic features of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Neurology*, *54*(1), 40–44. <https://doi.org/10.1212/wnl.54.1.40>
- Antoniadi, T., Buxton, C., Dennis, G., Forrester, N., Smith, D., Lunt, P., & Burton-Jones, S. (2015). Application of targeted multi-gene panel testing for the diagnosis of inherited peripheral neuropathy provides a high diagnostic yield with unexpected phenotype-genotype variability. *BMC Medical Genetics*, *16*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12881-015-0224-8>
- Arthur-Farraj, P., Wanek, K., Hantke, J., Davis, C. M., Jayakar, A., Parkinson, D. B., Mirsky, R., & Jessen, K. R. (2011). Mouse schwann cells need both NRG1 and cyclic AMP to myelinate. *GLIA*, *59*(5), 720–733. <https://doi.org/10.1002/glia.21144>
- Attarian, S., Vallat, J. M., Magy, L., Funalot, B., Gonnaud, P. M., Lacour, A., Péréon, Y., Dubourg, O., Pouget, J., Micallef, J., Franques, J., Lefebvre, M. N., Ghorab, K., Al-Moussawi, M., Tiffreau, V., Preudhomme, M., Magot, A., Leclair-Visonneau, L., Stojkovic, T., ... Cohen, D. (2014). An exploratory randomised double-blind and placebo-controlled phase 2 study of a combination of baclofen, naltrexone and sorbitol (PXT3003) in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/s13023-014-0199-0>
- Auer-Grumbach, M., Strasser-Fuchs, S., Wagner, K., Körner, E., & Fazekas, F. (1998). Roussy-Levy syndrome is a phenotypic variant of Charcot-Marie-Tooth syndrome IA associated with a duplication on chromosome 17p11.2. *Journal of the Neurological Sciences*, *154*(1), 72–75. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(97\)00218-9](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(97)00218-9)
- Auer-Grumbach, M., Toegel, S., Schabhüttl, M., Weinmann, D., Chiari, C., Bennett, D. L. L. H., Beetz, C., Klein, D., Andersen, P. M. M., Böhme, I., Fink-Puches, R., Gonzalez, M., Harms, M. B. B., Motley, W., Reilly, M. M. M., Renner, W., Rudnik-Schöneborn, S., Schlotter-Weigel, B., Themistocleous, A. C. C., ... Senderek, J. (2016). Rare Variants in MME, Encoding Metalloprotease Neprilysin, Are Linked to Late-Onset Autosomal-Dominant Axonal Polyneuropathies. *American Journal of Human Genetics*, *99*(3), 607–623. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.07.008>
- Auranen, M., Ylikallio, E., Toppila, J., Somer, M., Kiuru-Enari, S., & Tyynismaa, H. (2013). Dominant GDAP1 founder mutation is a common cause of axonal Charcot-Marie-Tooth disease in Finland. *Neurogenetics*, *14*(2), 123–132. <https://doi.org/10.1007/s10048-013-0358-9>
- Austin, J. H. (1956). Observations on the syndrome of hypertrophic neuritis (The hypertrophic interstitial radiculo-neuropathies). In *Medicine (United States)* (Vol. 35, Issue 3, pp. 187–237). Medicine (Baltimore). <https://doi.org/10.1097/00005792-195609000-00002>
- Azzedine, H., Ravise, N., Verny, C., Gabreels-Festen, A., Lammens, M., Grid, D., Vallat, J. M., Durosier, G.,

- Senderek, J., Nouioua, S., Hamadouche, T., Bouhouche, A., Guilbot, A., Stendel, C., Ruberg, M., Brice, A., Birouk, N., Dubourg, O., Tazir, M., & LeGuern, E. (2006). Spine deformities in Charcot-Marie-Tooth 4C caused by SH3TC2 gene mutations. *Neurology*, *67*(4), 602–606. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000230225.19797.93>
- Azzedine, H., Ruberg, M., Ente, D., Gilardeau, C., Périé, S., Wechsler, B., Brice, A., LeGuern, E., & Dubourg, O. (2003). Variability of disease progression in a family with autosomal recessive CMT associated with a S194X and new R310Q mutation in the GDAP1 gene. *Neuromuscular Disorders: NMD*, *13*(4), 341–346. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12868504>
- Azzedine, H., Zavadakova, P., Planté-Bordeneuve, V., Vaz Pato, M., Pinto, N., Bartesaghi, L., Zenker, J., Poirot, O., Bernard-Marissal, N., Arnaud Gouttenoire, E., Cartoni, R., Title, A., Venturini, G., Médard, J.-J., Makowski, E., Schöls, L., Claeys, K. G., Stendel, C., Roos, A., ... Chrast, R. (2013). PLEKHG5 deficiency leads to an intermediate form of autosomal-recessive Charcot-Marie-Tooth disease. *Human Molecular Genetics*, *22*(20), 4224–4232. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt274>
- Bacquet, J., Stojkovic, T., Boyer, A., Martini, N., Audic, F., Chabrol, B., Salort-Campana, E., Delmont, E., Desvignes, J. P., Verschueren, A., Attarian, S., Chausse, A., Delague, V., Levy, N., & Bonello-Palot, N. (2018). Molecular diagnosis of inherited peripheral neuropathies by targeted next-generation sequencing: Molecular spectrum delineation. *BMJ Open*, *8*(10), 1–14. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-021632>
- Barreto, L. C. L. S., Oliveira, F. S., Nunes, P. S., De França Costa, I. M. P., Garcez, C. A., Goes, G. M., Neves, E. L. A., De Souza Siqueira Quintans, J., & De Souza Araújo, A. A. (2016). Epidemiologic Study of Charcot-Marie-Tooth Disease: A Systematic Review. *Neuroepidemiology*, *46*(3), 157–165. <https://doi.org/10.1159/000443706>
- Baxter, R. V., Othmane, K. B., Rochelle, J. M., Stajich, J. E., Hulette, C., Dew-Knight, S., Hentati, F., Hamida, M. B., Bel, S., Stenger, J. E., Gilbert, J. R., Pericak-Vance, M. A., & Vance, J. M. (2002). Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nature Genetics*, *30*(1), 21–22. <https://doi.org/10.1038/ng796>
- Beauvais, K., Furby, A., & Latour, P. (2006). Clinical, electrophysiological and molecular genetic studies in a family with X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy presenting a novel mutation in GJB1 Promoter and a rare polymorphism in LITAF/SIMPLE. *Neuromuscular Disorders*, *16*(1), 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2005.09.008>
- Berciano, J., Sevilla, T., Casanovas, C., Sivera, R., Vílchez, J. J., Infante, J., Ramón, C., Pelayo-Negro, A. L., Illa, I., & Programa 3 (Enfermedades Neuromusculares) del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) del Instituto de Salud Carlos III. (2012). Guía diagnóstica en el paciente con enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. *Neurología*, *27*(3), 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2011.04.015>
- Berciano, J., Gallardo, E., García, A., Ramón, C., Infante, J., & Combarros, O. (2010). Clinical progression in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication: Clinico-electrophysiological and MRI longitudinal study of a family. *Journal of Neurology*, *257*(10), 1633–1641. <https://doi.org/10.1007/s00415-010-5580-x>
- Berciano, J., García, A., Gallardo, E., Peeters, K., Pelayo-Negro, A. L., Álvarez-Paradelo, S., Gazulla, J., Martínez-Tames, M., Infante, J., & Jordanova, A. (2017). Intermediate Charcot-Marie-Tooth disease: an electrophysiological reappraisal and systematic review. *Journal of Neurology*, *264*(8), 1655–1677. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8474-3>
- Berciano, J., García, A., Peeters, K., Gallardo, E., De Vriendt, E., Pelayo-Negro, A. L., Infante, J., & Jordanova, A.

- (2015). NEFL E396K mutation is associated with a novel dominant intermediate Charcot–Marie–Tooth disease phenotype. *Journal of Neurology*, 262(5), 1289–1300. <https://doi.org/10.1007/s00415-015-7709-4>
- Berciano, J., Peeters, K., García, A., López-Alburquerque, T., Gallardo, E., Hernández-Fabián, A., Pelayo-Negro, A. L., De Vriendt, E., Infante, J., & Jordanova, A. (2016). NEFL N98S mutation: another cause of dominant intermediate Charcot–Marie–Tooth disease with heterogeneous early-onset phenotype. *Journal of Neurology*, 263(2), 361–369. <https://doi.org/10.1007/s00415-015-7985-z>
- Berger, J. R., Ayyar, D. R., Kimura, I., & Kovacs, A. (1985). Myasthenia gravis complicating Charcot-Marie-Tooth disease: report of a case. *J Clin Neuroophthalmol*, 2(June), 76–80. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2947920/>
- Biancheri, R., Zara, F., Striano, P., Pedemonte, M., Cassandrini, D., Stringara, S., Manganelli, F., Santoro, L., Schenone, A., Bellone, E., & Minetti, C. (2006). GDAP1 mutation in autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth with pyramidal features. *Journal of Neurology*, 253(9), 1234–1235. <https://doi.org/10.1007/s00415-006-0149-4>
- Bienfait, H. M. E., Baas, F., Koelman, J. H. T. M., De Haan, R. J., Van Engelen, B. G. M., Gabreëls-Festen, A. A. W. M., Ongerboer De Visser, B. W., Meggouh, F., Weterman, M. A. J., De Jonghe, P., Timmerman, V., & De Visser, M. (2007). Phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease Type 2. *Neurology*, 68(20), 1658–1667. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000263479.97552.94>
- Bienfait, H. M. E., Verhamme, C., Schaik, I. N., Koelman, J. H. T. M., Visser, B. W. O., Haan, R. J., Baas, F., Engelen, B. G. M., & Visser, M. (2006). Comparison of CMT1A and CMT2: similarities and differences. *Journal of Neurology*, 253(12), 1572–1580. <https://doi.org/10.1007/s00415-006-0260-6>
- Bird, T. D. (1999). Historical perspective of defining Charcot-Marie-Tooth type 1B. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 883, Issue 1, pp. 6–13). New York Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08561.x>
- Bird, T. D., Ott, J., & Giblett, E. R. (1982). Evidence for Linkage of Charcot-Marie-Tooth Neuropathy to the Duffy Locus on Chromosome 1. *Am J Hum Genet*, 34(3), 388–394. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6952764/>
- Bird, T. D., Ott, J., Giblett, E. R., Chance, P. F., Sumi, S. M., & Kraft, G. H. (1983). Genetic linkage evidence for heterogeneity in Charcot-Marie-Tooth neuropathy (HMSN type I). *Annals of Neurology*, 14(6), 679–684. <https://doi.org/10.1002/ana.410140612>
- Birouk, N., Azzedine, H., Dubourg, O., Muriel, M.-P., Benomar, A., Hamadouche, T., Maisonobe, T., Ouazzani, R., Brice, A., Yahyaoui, M., Chkili, T., & Le Guern, E. (2003). Phenotypical Features of a Moroccan Family With Autosomal Recessive Charcot-Marie-Tooth Disease Associated With the S194X Mutation in the GDAP1 Gene. *Archives of Neurology*, 60(4), 598. <https://doi.org/10.1001/archneur.60.4.598>
- Birouk, N., Gouider, R., Le Guern, E., Gugenheim, M., Tardieu, S., Maisonobe, T., Le Forestier, N., Agid, Y., Brice, A., & Bouche, P. (1997). Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with 17p11.2 duplication. Clinical and electrophysiological phenotype study and factors influencing disease severity in 119 cases. *Brain*, 120 ( Pt 5), 813–823. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9183252>
- Birouk, N., LeGuern, E., Maisonobe, T., Rouger, H., Gouider, R., Tardieu, S., Gugenheim, M., Routon, M. C., Léger, J. M., Agid, Y., Brice, A., & Bouche, P. (1998). X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with connexin 32 mutations: clinical and electrophysiologic study. *Neurology*, 50(4), 1074–1082. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566397>

- Blair, I. P., Nash, J., Gordon, M. J., & Nicholson, G. A. (1996). Prevalence and origin of de novo duplications in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: first report of a de novo duplication with a maternal origin. *American Journal of Human Genetics*, *58*(3), 472. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1914557/?page=2>
- Boentert, M., Knop, K., Schuhmacher, C., Gess, B., Okegwo, A., & Young, P. (2014). Sleep disorders in Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *85*(3), 319–325. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2013-305296>
- Boerkoel, C. F., Takashima, H., Bacino, C. A., Daentl, D., & Lupski, J. R. (2001). EGR2 mutation R359W causes a spectrum of Dejerine-Sottas neuropathy. *Neurogenetics*, *3*(3), 153–157. <https://doi.org/10.1007/s100480100107>
- Boerkoel, Cornelius F, Takashima, H., & Lupski, J. R. (2002). The genetic convergence of Charcot-Marie-Tooth disease types 1 and 2 and the role of genetics in sporadic neuropathy. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, *2*(1), 70–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11898586>
- Bombelli, F., Stojkovic, T., Dubourg, O., Echaniz-Laguna, A., Tardieu, S., Larcher, K., Amati-Bonneau, P., Latour, P., Vignal, O., Cazeneuve, C., Brice, A., & Leguern, E. (2014). Charcot-marie-tooth disease type 2A: From typical to rare phenotypic and genotypic features. *JAMA Neurology*, *71*(8), 1036–1042. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.629>
- Bouhouche, A., Birouk, N., Azzedine, H., Benomar, A., Durosier, G., Ente, D., Muriel, M.-P., Ruberg, M., Slassi, I., Yahyaoui, M., Dubourg, O., Ouazzani, R., & LeGuern, E. (2007). Autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease (ARCMT2): phenotype-genotype correlations in 13 Moroccan families. *Brain: A Journal of Neurology*, *130*(Pt 4), 1062–1075. <https://doi.org/10.1093/brain/awm014>
- Braathen, G. J. (2012). Genetic Epidemiology of Charcot – Marie – Tooth Disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, *126*(Suppl. 193). <https://doi.org/10.1111/ane.12013>
- Braathen, G. J., Sand, J. C., Lobato, A., Høyer, H., & Russell, M. B. (2010). MFN2 point mutations occur in 3.4% of Charcot-Marie-Tooth families. An investigation of 232 Norwegian CMT families. *BMC Medical Genetics*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2350-11-48>
- Briani, C., Taioli, F., Lucchetta, M., Bombardi, R., & Fabrizi, G. M. (2010). Adult onset Charcot-Marie-Tooth disease type 1D with an Arg381Cys mutation of EGR2. In *Muscle and Nerve* (Vol. 41, Issue 6, pp. 888–889). Muscle Nerve. <https://doi.org/10.1002/mus.21663>
- Bruno, C., Bertini, E., Federico, A., Tonoli, E., Lispi, M. L., Cassandrini, D., Pedemonte, M., Santorelli, F. M., Filocamo, M., Dotti, M. T., Schenone, A., Malandrini, A., & Minetti, C. (2004). Clinical and molecular findings in patients with giant axonal neuropathy (GAN). *Neurology*, *62*(1), 13–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14718689>
- Burns, J., Ouvrier, R. A., Yiu, E. M., Joseph, P. D., Kornberg, A. J., Fahey, M. C., & Ryan, M. M. (2009). Ascorbic acid for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A in children: a randomised, double-blind, placebo-controlled, safety and efficacy trial. *The Lancet Neurology*, *8*(6), 537–544. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70108-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70108-5)
- Callegari, I., Gemelli, C., Geroldi, A., Veneri, F., Mandich, P., D'Antonio, M., Pareyson, D., Shy, M. E., Schenone, A., Prada, V., & Grandis, M. (2019). Mutation update for myelin protein zero-related neuropathies and the increasing role of variants causing a late-onset phenotype. *Journal of Neurology*, *266*(11), 2629–2645. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09453-3>

- Chance, P. F., Alderson, M. K., Leppig, K. A., Lensch, M. W., Matsunami, N., Smith, B., Swanson, P. D., Odelberg, S. J., Distèche, C. M., & Bird, T. D. (1993). DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell*, *72*(1), 143–151. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8422677>
- Chance, P. F. (2006). Inherited Focal, Episodic Neuropathies: Hereditary Neuropathy With Liability to Pressure Palsies and Hereditary Neuralgic Amyotrophy. *NeuroMolecular Medicine*, *8*(1–2), 159–174. <https://doi.org/10.1385/nmm:8:1:159>
- Chao, H. C., Chou, C. T., Lee, Y. C., & Lin, K. P. (2015). Coexistence of Charcot Marie Tooth disease type 1A and diabetes in Taiwan: A clinicopathological study. *Journal of the Neurological Sciences*, *358*(1–2), 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.08.1539>
- Charcot, J. M., & Marie, P. (1886). Sur une forme particulière d'atrophie musculaire progressive, souvent familiale, débutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains. *Rev Neurol*, *6*, 97–138.
- Chen, C. M., Chang, H. S., Lyu, R. K., Tang, L. M., & Chen, S. T. (1997). Myasthenia gravis and Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: An unusual combination of diseases. *Muscle and Nerve*, *20*(11), 1457–1459. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4598\(199711\)20:11<1457::AID-MUS16>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4598(199711)20:11<1457::AID-MUS16>3.0.CO;2-Z)
- Chetlin, R. D., Gutmann, L., Tarnopolsky, M., Ullrich, I. H., & Yeater, R. A. (2004). Resistance training effectiveness in patients with charcot-marie-tooth disease: Recommendations for exercise prescription. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, *85*(8), 1217–1223. <https://doi.org/10.1016/j.apmr.2003.12.025>
- Choi, B. O., Koo, S. K., Park, M. H., Rhee, H., Yang, S. J., Choi, K. G., Jung, S. C., Kim, H. S., Hyun, Y. S., Nakhro, K., Lee, H. J., Woo, H. M., & Chung, K. W. (2012). Exome sequencing is an efficient tool for genetic screening of Charcot-Marie-Tooth Disease. *Human Mutation*, *33*(11), 1610–1615. <https://doi.org/10.1002/humu.22143>
- Chumakov, I., Milet, A., Cholet, N., Primas, G., Boucard, A., Pereira, Y., Graudens, E., Mandel, J., Laffaire, J., Fouquier, J., Glibert, F., Bertrand, V., Nave, K.-A., Sereda, M. W., Vial, E., Guedj, M., Hajj, R., Nabitochkin, S., & Cohen, D. (2014). Polytherapy with a combination of three repurposed drugs (PXT3003) down-regulates Pmp22 over-expression and improves myelination, axonal and functional parameters in models of CMT1A neuropathy. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *9*(1), 201. <https://doi.org/10.1186/s13023-014-0201-x>
- Chung, K. W., Kim, S. M., Sunwoo, I. N., Cho, S. Y., Hwang, S. J., Kim, J., Kang, S. H., Park, K.-D., Choi, K.-G., Choi, I. S., & Choi, B.-O. (2008). A novel GDAP1 Q218E mutation in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *Journal of Human Genetics*, *53*(4), 360–364. <https://doi.org/10.1007/s10038-008-0249-3>
- Claramunt, R., Pedrola, L., Sevilla, T., López de Munain, A., Berciano, J., Cuesta, A., Sánchez-Navarro, B., Millán, J. M., Saifi, G. M., Lupski, J. R., Vílchez, J. J., Espinós, C., & Palau, F. (2005). Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *Journal of Medical Genetics*, *42*(4), 358–365. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.022178>
- Claramunt, R., Sevilla, T., Lupo, V., Cuesta, A., Millán, J., Vílchez, J., Palau, F., & Espinós, C. (2007). The p.R1109X mutation in SH3TC2 gene is predominant in Spanish Gypsies with Charcot-Marie-Tooth disease type 4. *Clinical Genetics*, *71*(4), 343–349. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00774.x>
- Colomban, C., Micallef, J., Lefebvre, M. N., Dubourg, O., Gonnaud, P. M., Stojkovic, T., Jouve, E., Blin, O., Pouget, J., & Attarian, S. (2014). Clinical spectrum and gender differences in a large cohort of Charcot-Marie-Tooth type 1A patients. *Journal of the Neurological Sciences*, *336*(1–2), 155–160.

<https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.10.029>

- Colomer, J., Gooding, R., Angelicheva, D., King, R. H. M., Guillén-Navarro, E., Parman, Y., Nascimento, A., Conill, J., & Kalaydjieva, L. (2006). Clinical spectrum of CMT4C disease in patients homozygous for the p.Arg1109X mutation in SH3TC2. *Neuromuscular Disorders*, 16(7), 449–453. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2006.05.005>
- Combarros, O., Calleja, J., Polo, J. M., & Berciano, J. (1987). Prevalence of hereditary motor and sensory neuropathy in Cantabria. *Acta Neurologica Scandinavica*, 75(1), 9–12. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1987.tb07882.x>
- Cortese, A., Wilcox, J. E., Polke, J. M., Poh, R., Skorupinska, M., Rossor, A. M., Laura, M., Tomaselli, P. J., Houlden, H., Shy, M. E., & Reilly, M. M. (2020). Targeted next-generation sequencing panels in the diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology*, 94(1), e51–e61. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000008672>
- Cuesta, A., Pedrola, L., Sevilla, T., García-Planells, J., Chumillas, M. J., Mayordomo, F., LeGuern, E., Marín, I., Vílchez, J. J., & Palau, F. (2002). The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nature Genetics*, 30(1), 22–25. <https://doi.org/10.1038/ng798>
- Davis, C. J., Bradley, W. G., & Madrid, R. (1978). The peroneal muscular atrophy syndrome: clinical, genetic, electrophysiological and nerve biopsy studies. I. Clinical, genetic and electrophysiological findings and classification. *Journal de Genetique Humaine*, 26(4), 311–349. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/752065>
- Dawidenkow, S. (1927). Uber die neurotische Muskelatrophie Charcot- Marie. Klinisch-genetische studien. *Z Neurol*, 107, 259–320.
- Dejerine, J. J., & Sottas, J. (1893). Sur la névrite interstitielle, hypertrophique et progressive de l'enfance. *C R Soc Biol*, 45, 63–96.
- den Dunnen, J. T., Dalgleish, R., Maglott, D. R., Hart, R. K., Greenblatt, M. S., McGowan-Jordan, J., Roux, A. F., Smith, T., Antonarakis, S. E., & Taschner, P. E. M. (2016). HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Human Mutation*, 37(6), 564–569. <https://doi.org/10.1002/humu.22981>
- Dewey, F. E., Grove, M. E., Pan, C., Goldstein, B. A., Bernstein, J. A., Chaib, H., Merker, J. D., Goldfeder, R. L., Enns, G. M., David, S. P., Pakdaman, N., Ormond, K. E., Caleshu, C., Kingham, K., Klein, T. E., Whirl-Carrillo, M., Sakamoto, K., Wheeler, M. T., Butte, A. J., ... Quertermous, T. (2014). Clinical interpretation and implications of whole-genome sequencing. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 311(10), 1035–1044. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.1717>
- DiVincenzo, C., Elzinga, C. D., Medeiros, A. C., Karbassi, I., Jones, J. R., Evans, M. C., Braastad, C. D., Bishop, C. M., Jaremko, M., Wang, Z., Liaquat, K., Hoffman, C. A., York, M. D., Batish, S. D., Lupski, J. R., & Higgins, J. J. (2014). The allelic spectrum of Charcot-Marie-Tooth disease in over 17,000 individuals with neuropathy. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 2(6), 522–529. <https://doi.org/10.1002/mgg3.106>
- Dreher, T., Beckmann, N. A., & Wenz, W. (2015). Surgical treatment of severe cavovarus foot deformity in charcot-marie-tooth disease. *JBJS Essential Surgical Techniques*, 5(2). <https://doi.org/10.2106/JBJS.ST.N.00005>
- Duan, X., Gu, W., Hao, Y., Wang, R., Wen, H., Sun, S., Jiao, J., & Fan, D. (2016). A Novel Asp121Asn Mutation of

- Myelin Protein Zero Is Associated with Late-Onset Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease, Hearing Loss and Pupil Abnormalities. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8(SEP), 222. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00222>
- Dubourg, O., Azzedine, H., Verny, C., Durosier, G., Birouk, N., Gouider, R., Salih, M., Bouhouche, A., Thiam, A., Grid, D., Mayer, M., Ruberg, M., Tazir, M., Brice, A., & LeGuern, E. (2006). Autosomal-recessive forms of demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease. *NeuroMolecular Medicine*, 8(1–2), 75–85. <https://doi.org/10.1385/NMM:8:1-2:75>
- Dyck, P. J., & Lambert, E. H. (1968a). Lower Motor and Primary Sensory Neuron Diseases With Peroneal Muscular Atrophy: I. Neurologic, Genetic, and Electrophysiologic Findings in Hereditary Polyneuropathies. *Archives of Neurology*, 18(6), 603–618. <https://doi.org/10.1001/archneur.1968.00470360025002>
- Dyck, P. J., & Lambert, E. H. (1968b). Lower Motor and Primary Sensory Neuron Diseases With Peroneal Muscular Atrophy: II. Neurologic, Genetic, and Electrophysiologic Findings in Various Neuronal Degenerations. *Archives of Neurology*, 18(6), 619–625. <https://doi.org/10.1001/archneur.1968.00470360041003>
- Dyck, P. J., Lambert, E. H., & Mulder, D. W. (1963). Charcot-marie-tooth disease: Nerve conduction and clinical studies of a large kinship. *Neurology*, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1212/wnl.13.1.1>
- Dyck, P. J., Ott, J., Moore, S. B., Swanson, C. J., & Lambert, E. H. (1983). Linkage Evidence for Genetic Heterogeneity Among Kinships With Hereditary Motor and Sensory Neuropathy Type I. *Mayo Clin Proc*, 58(7), 430–435. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6865476/>
- Dyck, P. J., & Thomas, P. K. (1975). Inherited neuronal degeneration and atrophy affecting peripheral motor, sensory, and autonomic neurons. In Saunders (Ed.), *Peripheral Neuropathy* (p. vol 2. 829–839).
- Dyck, P. J., Thomas, P., & Lambert, E. H. (1975). *Peripheral neuropathy*.
- Eggers, S. D. Z., Keswani, S. C., Melli, G., & Cornblath, D. R. (2004). Clinical and genetic description of a family with Charcot-Marie-Tooth disease type 1B from a transmembrane MPZ mutation. *Muscle and Nerve*, 29(6), 867–869. <https://doi.org/10.1002/mus.20034>
- El Mhandi, L., Millet, G. Y., Calmels, P., Richard, A., Oullion, R., Gautheron, V., & Féasson, L. (2008). Benefits of interval-training on fatigue and functional capacities in charcot-marie-tooth disease. *Muscle and Nerve*, 37(5), 601–610. <https://doi.org/10.1002/mus.20959>
- England, J. D., Gronseth, G. S., Franklin, G., Carter, G. T., Kinsella, L. J., Cohen, J. A., Asbury, A. K., Szigeti, K., Lupski, J. R., Latov, N., Lewis, R. A., Low, P. A., Fisher, M. A., Herrmann, D. N., Howard, J. F., Lauria, G., Miller, R. G., Polydefkis, M., & Sumner, A. J. (2009). Practice Parameter: Evaluation of distal symmetric polyneuropathy: Role of laboratory and genetic testing (an evidence-based review): Report of the American Academy of Neurology, American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine, and American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. *Neurology*, 72(2), 185–192. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000336370.51010.a1>
- Falconer, D. S. (1951). Two new mutants, “trembler” and “reeler”, with neurological actions in the house mouse (*Mus musculus* L.). *Journal of Genetics*, 50(2), 192–205. <https://doi.org/10.1007/BF02996215>
- Ferraro, F., Dusina, B., Carantini, I., Strambi, R., Galante, E., & Gaiani, L. (2017). The efficacy of functional surgery associated with early intensive rehabilitation therapy in Charcot-Marie-Tooth Type 1A disease. *European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine*, 53(5), 788–793. <https://doi.org/10.23736/S1973-9087.17.04448-3>

- Fledrich, R., Stassart, R. M., Klink, A., Rasch, L. M., Prukop, T., Haag, L., Czesnik, D., Kungl, T., Abdelaal, T. A. M., Keric, N., Stadelmann, C., Brück, W., Nave, K. A., & Sereda, M. W. (2014). Soluble neuregulin-1 modulates disease pathogenesis in rodent models of Charcot-Marie-Tooth disease 1A. *Nature Medicine*, *20*(9), 1055–1061. <https://doi.org/10.1038/nm.3664>
- Foley, C., Schofield, I., Eglon, G., Bailey, G., Chinnery, P. F., & Horvath, R. (2012). Charcot–Marie–Tooth disease in Northern England. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *83*(5), 572–573. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2011-300285>
- Forst, R., & Ingenhorst, A. (2005). Orthopedic aspects in diagnosis, clinical management and therapy of CMT patients. *Hereditary Peripheral Neuropathies*, 206–226. [https://doi.org/10.1007/3-7985-1586-7\\_14](https://doi.org/10.1007/3-7985-1586-7_14)
- Fridman, V., Bundy, B., Reilly, M. M., Pareyson, D., Bacon, C., Burns, J., Day, J., Feely, S., Finkel, R. S., Grider, T., Kirk, C. A., Herrmann, D. N., Laurá, M., Li, J., Lloyd, T., Sumner, C. J., Muntoni, F., Piscoquito, G., Ramchandren, S., ... Shy, M. E. (2015). CMT subtypes and disease burden in patients enrolled in the Inherited Neuropathies Consortium natural history study: A cross-sectional analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *86*(8), 873–878. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-308826>
- Fusco, C., Spagnoli, C., Salerno, G. G., Pavlidis, E., Frattini, D., Pisani, F., & Bassi, M. T. (2019). Charcot-Marie-Tooth disease with pyramidal features due to a new mutation of EGR2 gene. *Acta Bio-Medica : Atenei Parmensis*, *90*(1), 104–107. <https://doi.org/10.23750/abm.v90i1.6951>
- Gemignani, F., Melli, G., Alfieri, S., Inglese, C., & Marbini, A. (2004). Sensory manifestations in Charcot-Marie-Tooth disease. *Journal of the Peripheral Nervous System: JPNS*, *9*(1), 7–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14871449>
- Gess, B., Baets, J., De Jonghe, P., Reilly, M. M., Pareyson, D., & Young, P. (2015). Ascorbic acid for the treatment of Charcot-Marie-Tooth disease. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Vol. 2015, Issue 12). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011952>
- Gess, B., Schirmacher, A., Boentert, M., & Young, P. (2013). Charcot-Marie-Tooth disease: Frequency of genetic subtypes in a German neuromuscular center population. *Neuromuscular Disorders*, *23*(8), 647–651. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2013.05.005>
- Gilliat, R. W., & Thomas, P. K. (1957). Extreme Slowing of Nerve Conduction in Peroneal Muscular Atrophy. *Ann Phys Med.*, *4*(3), 104–106. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13459253/>
- Ginsberg, L., Malik, O., Kenton, A. R., Sharp, D., Muddle, J. R., Davis, M. B., Winer, J. B., Orrell, R. W., & King, R. H. M. (2004). Coexistent Hereditary and Inflammatory Neuropathy. *Brain*, *127*((Pt 1)), 193–202. <https://doi.org/doi:10.1093/brain/awh017>
- Gonzaga-Jauregui, C., Tamar, H., Gambin, T., Kousi, M., Griffin, L. B., Francescatto, L., Ozes, B., Karaca, E., Jhangiani, S., Bainbridge, M. N., Lawson, K. S., Pehlivan, D., Okamoto, Y., Withers, M., Mancias, P., Slavotinek, A., Reitnauer, P. J., Goksungur, M. T., Shy, M., ... Lupski, J. R. (2015). Exome sequence analysis suggests genetic burden contributes to phenotypic variability and complex neuropathy. *Cell Rep*, *12*(7), 1169–1183. <https://doi.org/doi:10.1016/j.celrep.2015.07.023>
- Gosselin, I., Thiffault, I., Tétrault, M., Chau, V., Dicaire, M. J., Loisel, L., Emond, M., Senderek, J., Mathieu, J., Dupré, N., Vanasse, M., Puymirat, J., & Brais, B. (2008). Founder SH3TC2 mutations are responsible for a CMT4C French-Canadians cluster. *Neuromuscular Disorders*, *18*(6), 483–492. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2008.04.001>
- Guillebaste, B., Calmels, P., & Rougier, P. R. (2011). Assessment of appropriate ankle-foot orthoses models for

- patients with charcot-marie-tooth disease. *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 90(8), 619–627. <https://doi.org/10.1097/PHM.0b013e31821f7172>
- Guiloff, R. J., Thomas, P. K., Contreras, M., Armitage, S., Schwarz, G., & Sedgwick, E. M. (1982). Linkage of autosomal dominant type I hereditary motor and sensory neuropathy to the Duffy locus on chromosome 1. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 45(8), 669–674. <https://doi.org/10.1136/jnnp.45.8.669>
- Gumundsson, B., Ólafsson, E., Jakobsson, F., & Lúvígsson, P. (2010). Prevalence of symptomatic charcot-Marie-Tooth disease in Iceland: A study of a well-defined population. *Neuroepidemiology*, 34(1), 13–17. <https://doi.org/10.1159/000255461>
- Harding, A. E. (1981). Friedreich's ataxia: A clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain*, 104(3), 589–620. <https://doi.org/10.1093/brain/104.3.589>
- Harding, A. E. (1988). Inherited Neuropathies. *Current Opinión in Neurology and Neurosurgery*, 1, 788–792.
- Harding, A. E., & Thomas, P. K. (1980a). The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain : A Journal of Neurology*, 103(2), 259–280. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7397478>
- Harding, A. E., & Thomas, P. K. (1980b). Genetic aspects of hereditary motor and sensory neuropathy (types I and II). *Journal of Medical Genetics*, 17(5), 329–336. <https://doi.org/10.1136/jmg.17.5.329>
- Harding, A. E., & Thomas, P. K. (1984). Peroneal muscular atrophy with pyramidal features. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 47(2), 168–172. <https://doi.org/10.1136/jnnp.47.2.168>
- Hartley, T., Wagner, J. D., Warman-Chardon, J., Tétreault, M., Brady, L., Baker, S., Tarnopolsky, M., Bourque, P. R., Parboosingh, J. S., Smith, C., McInnes, B., Innes, A. M., Bernier, F., Curry, C. J., Yoon, G., Horvath, G. A., Bareke, E., Gillespie, M., Majewski, J., ... Boycott, K. M. (2018). Whole-exome sequencing is a valuable diagnostic tool for inherited peripheral neuropathies: Outcomes from a cohort of 50 families. *Clinical Genetics*, 93(2), 301–309. <https://doi.org/10.1111/cge.13101>
- Hashiguchi, A., Higuchi, Y., Nomura, M., Nakamura, T., Arata, H., Yuan, J., Yoshimura, A., Okamoto, Y., Matsuura, E., & Takashima, H. (2014). Neurofilament light mutation causes hereditary motor and sensory neuropathy with pyramidal signs. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 19(4), 311–316. <https://doi.org/10.1111/jns.12102>
- Hayasaka, K., Himoro, M., Sato, W., Takada, G., Uyemura, K., Shimizu, N., Bird, T. D., Conneally, P. M., & Chance, P. F. (1993). Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P0 gene. *Nature Genetics*, 5(1), 31–34. <https://doi.org/10.1038/ng0993-31>
- Hayasaka, K., Himoro, M., Wang, Y., Takata, M., Minoshima, S., Shimizu, N., Miura, M., Uyemura, K., & Takada, G. (1993). Structure and Chromosomal Localization of the Gene Encoding the Human Myelin Protein Zero (MPZ). *Genomics*, 17(3), 755–758. <https://doi.org/10.1006/geno.1993.1400>
- Heimler, A., Friedman, E., & Rosenthal, A. D. (1978). Naevoid basal cell carcinoma syndrome and Charcot-Marie-Tooth disease. Two autosomal dominant disorders segregating in a family. *Journal of Medical Genetics*, 15(4), 288–291. <https://doi.org/10.1136/jmg.15.4.288>
- Hiatt, S. M., Amaral, M. D., Bowling, K. M., Finnilla, C. R., Michelle, L. T., Gray, D. E., Lawlor, J. M. J., Cochran, J. N., Bebin, E. M., Brothers, K. B., East, K. M., Kelley, W. V., Lamb, N. E., Levy, S. E., Lose, E. J., Neu, M. B., Rich, C. A., Simmons, S., Myers, R. M., ... Cooper, G. M. (2018). Systematic reanalysis of genomic data

- improves quality of variant interpretation. *Clin Genet*, 94(1), 174–178. <https://doi.org/10.1111/cge.13259>.Systematic
- Higuchi, Y., Hashiguchi, A., Yuan, J., Yoshimura, A., Mitsui, J., Ishiura, H., Tanaka, M., Ishihara, S., Tanabe, H., Nozuma, S., Okamoto, Y., Matsuura, E., Ohkubo, R., Inamizu, S., Shiraishi, W., Yamasaki, R., Ohyagi, Y., Kira, J. I., Oya, Y., ... Takashima, H. (2016). Mutations in MME cause an autosomal-recessive Charcot-Marie-Tooth disease type 2. *Annals of Neurology*, 79(4), 659–672. <https://doi.org/10.1002/ana.24612>
- Holmberg, B. H. (1993). Charcot-Marie-Tooth disease in northern Sweden: an epidemiological and clinical study. *Acta Neurologica Scandinavica*, 87(5), 416–422. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8333247>
- Horga, A., Laurà, M., Jaunmuktane, Z., Jerath, N. U., Gonzalez, M. A., Polke, J. M., Poh, R., Blake, J. C., Liu, Y.-T., Wiethoff, S., Bettencourt, C., Lunn, M. P., Manji, H., Hanna, M. G., Houlden, H., Brandner, S., Züchner, S., Shy, M., & Reilly, M. M. (2017). Genetic and clinical characteristics of *NEFL*-related Charcot-Marie-Tooth disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 88(7), 575–585. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2016-315077>
- Infante, J., García, A., Combarros, O., Mateo, J. I., Berciano, J., Sedano, M. J., Gutiérrez-Rivas, E. J., & Palau, F. (2001). Diagnostic strategy for familial and sporadic cases of neuropathy associated with 17p11.2 deletion. *Muscle & Nerve*, 24(9), 1149–1155. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11494267>
- Jang, S. W., LeBlanc, S. E., Roopra, A., Wrabetz, L., & Svaren, J. (2006). In vivo detection of Egr2 binding to target genes during peripheral nerve myelination. *Journal of Neurochemistry*, 98(5), 1678–1687. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04069.x>
- Jessen, K. R., & Mirsky, R. (1999). Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 22, Issue 9, pp. 402–410). Elsevier Current Trends. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01391-5](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01391-5)
- Jo, H. Y., Park, M. H., Woo, H. M., Han, M. H., Kim, B. Y., Choi, B. O., Chung, K. W., & Koo, S. K. (2016). Application of whole-exome sequencing for detecting copy number variants in CMT1A/HNPP. *Clinical Genetics*, 90(2), 177–181. <https://doi.org/10.1111/cge.12714>
- Johnson, N. E. (2015). Whole-exome sequencing in neurologic practice: Reducing the diagnostic odyssey. *Neurology: Genetics*, 1(4), 1–3. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000037>
- Jordanova, A., De Jonghe, P., Boerkoel, C. F., Takashima, H., De Vriendt, E., Ceuterick, C., Martin, J. J., Butler, I. J., Mancias, P., Pappasozomenos, S. C., Terespolsky, D., Potocki, L., Brown, C. W., Shy, M., Rita, D. A., Tournev, I., Kremensky, I., Lupski, J. R., & Timmerman, V. (2003). Mutations in the neurofilament light chain gene (*NEFL*) cause early onset severe Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain*, 126(3), 590–597. <https://doi.org/10.1093/brain/awg059>
- Karadima, G., Koutsis, G., Raftopoulou, M., Karletidi, K. M., Zambelis, T., Karandreas, N., & Panas, M. (2015). Mutational analysis of Greek patients with suspected hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP): A 15-year experience. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 20(2), 79–85. <https://doi.org/10.1111/jns.12125>
- Katirji, B., & Koontz, D. (2012). Disorders of Peripheral Nerves. In *Neurology in Clinical Practice* (Sixth Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4377-0434-1.00101-8>
- Kaya, F., Belin, S., Bourgeois, P., Micaleff, J., Blin, O., & Fontés, M. (2007). Ascorbic acid inhibits PMP22 expression by reducing cAMP levels. *Neuromuscular Disorders*, 17(3), 248–253. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2006.12.008>

- Kenis-Coskun, O., & Matthews, D. J. (2016). Rehabilitation issues in Charcot-Marie-Tooth disease. *Journal of Pediatric Rehabilitation Medicine*, 9(1), 31–34. <https://doi.org/10.3233/PRM-160359>
- Killian, J. M., Tiwari, P. S., Jacobson, S., Jackson, R. D., & Lupski, J. R. (1996). Longitudinal studies of the duplication form of Charcot-Marie-Tooth polyneuropathy. *Muscle & Nerve*, 19(1), 74–78. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4598\(199601\)19:1<74::AID-MUS10>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4598(199601)19:1<74::AID-MUS10>3.0.CO;2-3)
- King, R., & Ginsberg, L. (2013). The nerve biopsy. In *Handbook of clinical neurology* (Vol. 115, pp. 155–170). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52902-2.00009-6>
- Koutsis, G., Pandraud, A., Polke, J. M., Wood, N. W., Panas, M., Karadima, G., & Houlden, H. (2012). Novel peripheral myelin protein 22 (PMP22) micromutations associated with variable phenotypes in Greek patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain*, 135(8). <https://doi.org/10.1093/brain/aws034>
- Krajewski, K. M., Lewis, R. A., Fuerst, D. R., Turansky, C., Hinderer, S. R., Garbern, J., Kamholz, J., & Shy, M. E. (2000). Neurological Dysfunction and Axonal Degeneration in Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A. *Brain*, 123(( Pt 7)), 1516–1527. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10869062/>
- Lambert, E. H. (1956). *Clinical Examinations in Neurology* (W. B. Saunders Company (ed.)).
- Laššuthová, P., Mazanec, R., Vondráček, P., Šišková, D., Haberlová, J., Sabová, J., & Seeman, P. (2011). High frequency of SH3TC2 mutations in Czech HMSN I patients. *Clinical Genetics*, 80(4), 334–345. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01640.x>
- Laššuthová, P., Šafka Brožková, D., Krůtová, M., Neupauerová, J., Haberlová, J., Mazanec, R., Dřimal, P., & Seeman, P. (2016). Improving diagnosis of inherited peripheral neuropathies through gene panel analysis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0500-5>
- Laurà, M., Hutton, E. J., Blake, J., Lunn, M. P., Fox, Z., Pareyson, D., Solari, A., Radice, D., Koltzenburg, M., & Reilly, M. M. (2014). Pain and small fiber function in charcot-marie-tooth disease type 1A. *Muscle & Nerve*, 50(3), 366–371. <https://doi.org/10.1002/mus.24169>
- Lee, A. J., Nam, S. H., Park, J. M., Kanwal, S., Choi, Y. J., Lee, H. J., Lee, K. S., Lee, J. E., Park, J. S., Choi, B. O., & Chung, K. W. (2019). Compound heterozygous mutations of SH3TC2 in Charcot–Marie–Tooth disease type 4C patients. *Journal of Human Genetics*, 4–8. <https://doi.org/10.1038/s10038-019-0636-y>
- Lee, J. S., Chang, E. H., Koo, O. J., Jwa, D. H., Mo, W. M., Kwak, G., Moon, H. W., Park, H. T., Hong, Y. Bin, & Choi, B. O. (2017). Pmp22 mutant allele-specific siRNA alleviates demyelinating neuropathic phenotype in vivo. *Neurobiology of Disease*, 100, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.01.006>
- Lee, S. M., Chin, L. S., & Li, L. (2012). Charcot-marie-tooth disease-linked protein SIMPLE functions with the ESCRT machinery in endosomal trafficking. *Journal of Cell Biology*, 199(5), 799–816. <https://doi.org/10.1083/jcb.201204137>
- Lee, S. M., Olzmann, J. A., Chin, L. S., & Li, L. (2011). Mutations associated with Charcot-Marie-Tooth disease cause SIMPLE protein mislocalization and degradation by the proteasome and aggresome-autophagy pathways. *Journal of Cell Science*, 124(19), 3319–3331. <https://doi.org/10.1242/jcs.087114>
- Lewis, R. A., McDermott, M. P., Herrmann, D. N., Hoke, A., Clawson, L. L., Siskind, C., Feely, S. M. E., Miller, L. J., Barohn, R. J., Smith, P., Luebke, E., Wu, X., & Shy, M. E. (2013). High-dosage ascorbic acid treatment in charcot-marie-tooth disease type 1A results of a randomized, double-masked, controlled trial. *JAMA Neurology*, 70(8), 981–987. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.3178>

- Li, J., Bai, Y., Ianakova, E., Grandis, M., Uchwat, F., Trostinskaia, A., Krajewski, K. M., Garbern, J., Kupsky, W. J., & Shy, M. E. (2006). Major myelin protein gene (P0) mutation causes a novel form of axonal degeneration. *Journal of Comparative Neurology*, *498*(2), 252–265. <https://doi.org/10.1002/cne.21051>
- Lin, D. J., Hermann, K. L., & Schmahmann, J. D. (2014). Multiple system atrophy of the cerebellar type: Clinical state of the art. *Movement Disorders*, *29*(3), 294–304. <https://doi.org/10.1002/mds.25847>
- Liu, L., & Zhang, R. (2014). Intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuroscience Bulletin*, *30*(6), 999–1009. <https://doi.org/10.1007/s12264-014-1475-7>
- Lorefice, L., Murru, M. R., Coghe, G., Fenu, G., Corongiu, D., Frau, J., Tranquilli, S., Tacconi, P., Vannelli, A., Marrosu, G., Mamusa, E., Cocco, E., & Marrosu, M. G. (2017). Charcot–Marie–Tooth disease: genetic subtypes in the Sardinian population. *Neurological Sciences*, *38*(6), 1019–1025. <https://doi.org/10.1007/s10072-017-2905-x>
- Lousa, M., Vázquez-Huarte-Mendicoa, C., Gutiérrez, A. J., Saavedra, P., Navarro, B., & Tugores, A. (2019). Genetic epidemiology, demographic, and clinical characteristics of Charcot-Marie-tooth disease in the island of Gran Canaria (Spain). *Journal of the Peripheral Nervous System*. <https://doi.org/10.1111/jns.12299>
- Louwerens, J. W. K. (2018). Algorithmus für die operative Behandlung von Fußdeformitäten bei der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit. In *Operative Orthopädie und Traumatologie* (Vol. 30, Issue 2, pp. 130–146). Urban und Vogel GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00064-018-0533-0>
- Lupo, V., Frassetto, M., Sánchez-Monteagudo, A., Pelayo-Negro, A. L., García-Sobrino, T., Sedano, M. J., Pardo, J., Misiego, M., García-García, J., Sobrido, M. J., Martínez-Rubio, M. D., Chumillas, M. J., Vílchez, J. J., Vázquez-Costa, J. F., Espinós, C., & Sevilla, T. (2018). Characterising the phenotype and mode of inheritance of patients with inherited peripheral neuropathies carrying MME mutations. *Journal of Medical Genetics*, 1–10. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105650>
- Lupo, V., García-García, F., Sancho, P., Tello, C., García-Romero, M., Villarreal, L., Alberti, A., Sivera, R., Dopazo, J., Pascual-Pascual, S. I., Márquez-Infante, C., Casasnovas, C., Sevilla, T., & Espinós, C. (2016). Assessment of Targeted Next-Generation Sequencing as a Tool for the Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth Disease and Hereditary Motor Neuropathy. *Journal of Molecular Diagnostics*, *18*(2), 225–234. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.10.005>
- Lupski, J. R., de Oca-Luna, R. M., Slaugenhaupt, S., Pentao, L., Guzzetta, V., Trask, B. J., Saucedo-Cardenas, O., Barker, D. F., Killian, J. M., Garcia, C. A., Chakravarti, A., & Patel, P. I. (1991). DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell*, *66*(2), 219–232. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90613-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90613-4)
- Mahmoud Ali Hewedi, K., Abdelmoety Monzer, M., Mohammad Sobh, K., Abdelhady Mohammad Aboelmakarem, M., Abdelghaffar Mohammady, A., Fathy Abdelsalam Mohammad, M., Ibrahim Helal, S., Author, C., & Ibrahim helal, S. (2019). Clinical and Neurophysiological Correlation in Axonal and Demyelinating Polyneuropathy. In *International Journal of Research Studies in Medical and Health Sciences* (Vol. 4, Issue 5).
- Manganelli, F., Pisciotto, C., Reilly, M., Tozza, S., Schenone, A., Fabrizi, G., Cavallaro, T., Vita, G., Padua, L., Gemignani, F., Laura, M., Hughes, R., Solari, A., Pareyson, D., Santoro, L., & CMT-TRIAAL and CMT-TRAUK Group. (2016). NERVE CONDUCTION VELOCITY IN CMT1A: WHAT ELSE CAN WE TELL. *European Journal of Neurology*, *23*(10), 1566. <https://doi.org/10.1111/ENE.13079>

- Manganelli, F., Tozza, S., Pisciotta, C., Bellone, E., Iodice, R., Nolano, M., Geroldi, A., Capponi, S., Mandich, P., & Santoro, L. (2014). Charcot-Marie-Tooth disease: Frequency of genetic subtypes in a Southern Italy population. *Journal of the Peripheral Nervous System*, *19*(4), 292–298. <https://doi.org/10.1111/jns.12092>
- Manto, M. U. (2005). The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). In *Cerebellum* (Vol. 4, Issue 1, pp. 2–6). Cerebellum. <https://doi.org/10.1080/14734220510007914>
- Marques, W., Freitas, M. R., Nascimento, O. J. M., Oliveira, A. B., Calia, L., Melo, A., Lucena, R., Rocha, V., & Barreira, A. A. (2005). 17p duplicated Charcot-Marie-Tooth 1A. *Journal of Neurology*, *252*(8), 972–979. <https://doi.org/10.1007/s00415-005-0797-9>
- Marttila, M., Kytövuori, L., Helisalmi, S., Kallio, M., Laitinen, M., Hiltunen, M., Kärppä, M., & Majamaa, K. (2017). Molecular Epidemiology of Charcot-Marie-Tooth Disease in Northern Ostrobothnia, Finland: A Population-Based Study. *Neuroepidemiology*, *49*(1–2), 34–39. <https://doi.org/10.1159/000478860>
- Mathis, S., Goizet, C., Tazir, M., Magdelaine, C., Lia, A. S., Magy, L., & Vallat, J. M. (2015). Charcot-Marie-Tooth diseases: An update and some new proposals for the classification. *Journal of Medical Genetics*, *52*(10), 681–690. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103272>
- Matsunami, N., Smith, B., Ballard, L., Lensch, M. W., Robertson, M., Albertsen, H., Hanemann, C. O., Müller, H. W., Bird, T. D., White, R., & Chance, P. F. (1992). Peripheral myelin protein-22 gene maps in the duplication in chromosome 17p11.2 associated with Charcot-Marie-Tooth 1A. *Nature Genetics*, *1*(3), 176–179. <https://doi.org/10.1038/ng0692-176>
- McCorquodale, D. S., Montenegro, G., Peguero, A., Carlson, N., Speziani, F., Price, J., Taylor, S. W., Melanson, M., Vance, J. M., Züchner, S., & Züchner, S. (2011). Mutation screening of mitofusin 2 in Charcot-Marie-Tooth disease type 2. *Journal of Neurology*, *258*(7), 1234–1239. <https://doi.org/10.1007/s00415-011-5910-7>
- Meienberg, J., Bruggmann, R., Oexle, K., & Matyas, G. (2016). Clinical sequencing: is WGS the better WES? *Human Genetics*, *135*(3), 359–362. <https://doi.org/10.1007/s00439-015-1631-9>
- Meier, C., Parmantier, E., Brennan, A., Mirsky, R., & Jessen, K. R. (1999). Developing schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving insulin-like growth factor, neurotrophin-3, and platelet-derived growth factor-BB. *Journal of Neuroscience*, *19*(10), 3847–3859. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-10-03847.1999>
- Melcangi, R. C., Magnaghi, V., Cavarretta, I., Zucchi, I., Bovolín, P., D'Urso, D., & Martini, R. (1999). Progesterone derivatives are able to influence peripheral myelin protein 22 and P0 gene expression: possible mechanisms of action. *J Neurosci Res*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10340743>
- Mersiyanova, I. V., Perepelov, A. V., Polyakov, A. V., Sitnikov, V. F., Dadali, E. L., Oparin, R. B., Petrin, A. N., & Evgrafov, O. V. (2000a). A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene. *American Journal of Human Genetics*, *67*(1), 37–46. <https://doi.org/10.1086/302962>
- Mersiyanova, I. V., Perepelov, A. V., Polyakov, A. V., Sitnikov, V. F., Dadali, E. L., Oparin, R. B., Petrin, A. N., & Evgrafov, O. V. (2000b). A New Variant of Charcot-Marie-Tooth Disease Type 2 Is Probably the Result of a Mutation in the Neurofilament-Light Gene. *The American Journal of Human Genetics*, *67*(1), 37–46. <https://doi.org/10.1086/302962>
- Miller, L. J., Patzko, A., Lewis, R. A., & Shy, M. E. (2012). Phenotypic presentation of the Ser63Del MPZ mutation. *Journal of the Peripheral Nervous System*, *17*(2), 197–200. <https://doi.org/10.1111/j.1529->

8027.2012.00398.x

- Milley, G. M., Varga, E. T., Grosz, Z., Nemes, C., Arányi, Z., Boczán, J., Diószeghy, P., Molnár, M. J., & Gál, A. (2018). Genotypic and phenotypic spectrum of the most common causative genes of Charcot-Marie-Tooth disease in Hungarian patients. *Neuromuscular Disorders*, 28(1), 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2017.08.007>
- Mori, L., Signori, A., Prada, V., Pareyson, D., Piscosquito, G., Padua, L., Pazzaglia, C., Fabrizi, G. M., Picelli, A., Schenone, A., Grandis, M., Maggi, G., Zuccariono, R., Marinelli, L., Trompetto, C., Scorsone, D., Montesano, A., Cattaneo, D., Casati, E., ... Munari, D. (2020). Treadmill training in patients affected by Charcot–Marie–Tooth neuropathy: results of a multicenter, prospective, randomized, single-blind, controlled study. *European Journal of Neurology*, 27(2), 280–287. <https://doi.org/10.1111/ene.14074>
- Morocutti, C., Colazza, G. B., Soldati, G., D’Alessio, C., Damiano, M., Casali, C., & Pierelli, F. (2002). Charcot-Marie-Tooth Disease in Molise, a Central-Southern Region of Italy: An Epidemiological Study. *Neuroepidemiology*, 21(5), 241–245. <https://doi.org/10.1159/000065642>
- Moss, K. R., Bopp, T. S., Johnson, A. E., & Höke, A. (2021). New evidence for secondary axonal degeneration in demyelinating neuropathies. *Neuroscience Letters*, 744. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135595>
- Mouton, P., Tardieu, S., Gouider, R., Birouk, N., Maisonobe, T., Dubourg, O., Brice, A., LeGuern, E., & Bouche, P. (1999). Spectrum of clinical and electrophysiologic features in HNPP patients with the 17p11.2 deletion. *Neurology*, 52(7), 1440–1446. <https://doi.org/10.1212/wnl.52.7.1440>
- Murphy, S. M., Laurá, M., Blake, J., Polke, J., Bremner, F., & Reilly, M. M. (2011). Conduction block and tonic pupils in Charcot-Marie-Tooth disease caused by a myelin protein zero p.Ile112Thr mutation. *Neuromuscular Disorders*, 21(3), 223–226. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.12.010>
- Murphy, S. M., Laurá, M., Fawcett, K., Pandraud, A., Davidson, G. L., Rossor, A. M., Polke, J. M., Manji, H., Lunn, M. P. T., Bull, K., Ramdharry, G., Blake, J. C., Houlden, H., & Reilly, M. M. (2012). Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 83(7), 706–710. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-302451>
- Nagarajan, R., Svaren, J., Le, N., Araki, T., Watson, M., & Milbrandt, J. (2001). EGR2 mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression. *Neuron*, 30(2), 355–368. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00282-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00282-3)
- Nam, S. H., Hong, Y. Bin, Hyun, Y. S., Nam, D. E., Kwak, G., Hwang, S. H., Choi, B. O., & Chung, K. W. (2016). Identification of genetic causes of inherited peripheral neuropathies by targeted gene panel sequencing. *Molecules and Cells*, 39(5), 382–388. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2288>
- Nelis, E., Erdem, S., Van Den Bergh, P. Y. K., Belpaire-Dethiou, M.-C., Ceuterick, C., Van Gerwen, V., Cuesta, A., Pedrola, L., Palau, F., Gabreëls-Festen, A. A. W. M., Verellen, C., Tan, E., Demirci, M., Van Broeckhoven, C., De Jonghe, P., Topaloglu, H., & Timmerman, V. (2002). Mutations in GDAP1: autosomal recessive CMT with demyelination and axonopathy. *Neurology*, 59(12), 1865–1872. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12499475>
- Nelis, E., Van Broeckhoven, C., De Jonghe, P., Löfgren, A., Vandenberghe, A., Latour, P., Le Guern, E., Brice, A., Mostacciuolo, M. L., Schiavon, F., Palau, F., Bort, S., Upadhyaya, M., Rocchi, M., Archidiacono, N., Mandich, P., Bellone, E., Silander, K., Savontaus, M. L., ... Gal, A. (1996). Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a European collaborative study. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 4(1), 25–33.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8800924>

- Neves, E. L. de A., & Kok, F. (2011). Clinical and neurophysiological investigation of a large family with dominant Charcot-Marie-Tooth type 2 disease with pyramidal signs. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, *69*(3), 424–430. <https://doi.org/10.1590/s0004-282x2011000400003>
- Nicholson, G. A., Valentijn, L. J., Cherryson, A. K., Kennerson, M. L., Bragg, T. L., Dekroon, R. M., Ross, D. A., Pollard, J. D., McLeod, J. G., Bolhuis, P. A., & Baas, F. (1994). A frame shift mutation in the PMP22 gene in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Nature Genetics*, *6*(3), 263–266. <https://doi.org/10.1038/ng0394-263>
- Nicholson, G., & Myers, S. (2006). Intermediate forms of Charcot-Marie-Tooth neuropathy: a review. *NeuroMolecular Medicine*, *9*(1), 123–130. <https://doi.org/10.1385/NMM:9:1>
- Nicolaou, P., Zamba-Papanicolaou, E., Koutsou, P., Kleopa, K. A., Georghiou, A., Hadjigeorgiou, G., Papadimitriou, A., Kyriakides, T., & Christodoulou, K. (2010). Charcot-Marie-Tooth Disease in Cyprus: Epidemiological, Clinical and Genetic Characteristics. *Neuroepidemiology*, *35*(3), 171–177. <https://doi.org/10.1159/000314351>
- Nolano, M., Manganelli, F., Provitera, V., Pisciotta, C., Stancanelli, A., Caporaso, G., Iodice, R., Shy, M. E., & Santoro, L. (2015). Small nerve fiber involvement in CMT1A. *Neurology*, *84*(4), 407–414. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001188>
- Othmane, K. B., Hentati, F., Lennon, F., Hamida, C. B., Blel, S., Roses, A. D., Pericak-Vance, M. A., Hamida, M. B., & Vance, J. M. (1993). Linkage of a Locus (CMT4A) for Autosomal Recessive Charcot-Marie-Tooth Disease to Chromosome 8q - PubMed. *Hum Mol Genet*, *2*(10), 1625-8. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.10.1625>.
- Panosyan, F. B., Laura, M., Rossor, A. M., Pisciotta, C., Piscoquito, G., Burns, J., Li, J., Yum, S. W., Lewis, R. A., Day, J., Horvath, R., Herrmann, D. N., Shy, M. E., Pareyson, D., Reilly, M. M., Scherer, S. S., & (INC-RDCRN), F. the I. N. C. D. C. R. N. (2017). Cross-sectional analysis of a large cohort with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX1). *Neurology*, *89*(9), 927. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004296>
- Pareyson, D., Scaioli, V., & Laurà, M. (2006). Clinical and Electrophysiological Aspects of Charcot-Marie-Tooth Disease. *NeuroMolecular Medicine*, *8*(1–2), 3–22. <https://doi.org/10.1385/nmm:8:1:3>
- Pareyson, D., Scaioli, V., Taroni, F., Botti, S., Lorenzetti, D., Solari, A., Ciano, C., & Sghirlanzoni, A. (1996). Phenotypic heterogeneity in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies associated with chromosome 17p11.2-12 deletion. *Neurology*, *46*(4), 1133–1137. <https://doi.org/10.1212/WNL.46.4.1133>
- Pareyson, D., & Marchesi, C. (2009). Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *The Lancet Neurology*, *8*(7), 654–667. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70110-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70110-3)
- Pareyson, D., Reilly, M. M., Schenone, A., Fabrizi, G. M., Cavallaro, T., Manganelli, L., Vita, G., Quattrone, A., Padua, L., Gemignani, F., Visioli, F., Laurà, M., Radice, D., Calabrese, D., Hughes, R. A. C., Solari, A., Salsano, C., Nanetti, L., Marelli, C., ... Sereda, M. (2011). Ascorbic acid in charcot-marie-tooth disease type 1A (CMTTRIAAL and CMT-TRAUK): A double-blind randomised trial. *The Lancet Neurology*, *10*(4), 320–328. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70025-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70025-4)
- Passage, E., Norreel, J. C., Noack-Fraissignes, P., Sanguedolce, V., Pizant, J., Thirion, X., Robaglia-Schlupp, A., Pellissier, J. F., & Fontés, M. (2004). Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nature Medicine*, *10*(4), 396–401. <https://doi.org/10.1038/nm1023>

- Patel, P. I., Roa, B. B., Welcher, A. A., Schoener-Scott, R., Trask, B. J., Pentao, L., Snipes, G. J., Garcia, C. A., Francke, U., Shooter, E. M., Lupski, J. R., & Suter, U. (1992). The gene for the peripheral myelin protein PMP-22 is a candidate for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nature Genetics*, *1*(3), 159–165. <https://doi.org/10.1038/ng0692-159>
- Perea, J., A, R., T, T., Muddle J, K. R., S, P., PK, T., & C., H. (2001). Induced myelination and demyelination in a conditional mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Human Molecular Genetics*, *10*(10), 1007–1018. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.10.1007>
- Pezzini, I., Geroldi, A., Capponi, S., Gulli, R., Schenone, A., Grandis, M., Doria-Lamba, L., La Piana, C., Cremonte, M., Pisciotta, C., Nolano, M., Manganelli, F., Santoro, L., Mandich, P., & Bellone, E. (2016). GDAP1 mutations in Italian axonal Charcot-Marie-Tooth patients: Phenotypic features and clinical course. *Neuromuscular Disorders*, *26*(1), 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2015.09.008>
- Pfeffer, G. B., Michalski, M., Nelson, T., An, T. W., & Metzger, M. (2020). Extensor Tendon Transfers for Treatment of Foot Drop in Charcot-Marie-Tooth Disease: A Biomechanical Evaluation. *Foot and Ankle International*, 1071100719901119. <https://doi.org/10.1177/1071100719901119>
- Pipis, M., Rossor, A. M., Laura, M., & Reilly, M. M. (2019). Next-generation sequencing in Charcot-Marie-Tooth disease: opportunities and challenges. *Nature Reviews Neurology*, *15*(11), 644–656. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0254-5>
- Piscosquito, G., Saveri, P., Magri, S., Ciano, C., Gandioli, C., Morbin, M., Bella, D. D., Moroni, I., Taroni, F., & Pareyson, D. (2016). Screening for SH3TC2 gene mutations in a series of demyelinating recessive Charcot-Marie-Tooth disease (CMT4). *Journal of the Peripheral Nervous System*, *21*(3), 142–149. <https://doi.org/10.1111/jns.12175>
- Planté-Bordeneuve, V., Guiochon-Mantel, A., Lacroix, C., Lapresle, J., & Said, G. (1999). The Roussy-Lévy family: From the original description to the gene. *Annals of Neurology*, *46*(5), 770–773. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(199911\)46:5<770::AID-ANA13>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1531-8249(199911)46:5<770::AID-ANA13>3.0.CO;2-U)
- Planté-Bordeneuve, V., Parman, Y., Guiochon-Mantel, A., Alj, Y., Deymeer, F., Serdaroglu, P., Eraksoy, M., & Said, G. (2001). The range of chronic demyelinating neuropathy of infancy: A clinico-pathological and genetic study of 15 unrelated cases. *Journal of Neural Transmission*, *108*(8–9), 795–803. <https://doi.org/10.1007/s004150170096>
- Prukop, T., Stenzel, J., Wernick, S., Kungl, T., Mroczek, M., Adam, J., Ewers, D., Nabirotkin, S., Nave, K. A., Hajj, R., Cohen, D., & Sereda, M. W. (2019). Early short-term PXT3003 combinational therapy delays disease onset in a transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease 1A (CMT1A). *PLoS ONE*, *14*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209752>
- Raeymaekers, P., Timmerman, V., Nelis, E., De Jonghe, P., Hoogenduk, J. E., Baas, F., Barker, D. F., Martin, J. J., De Visser, M., Bolhuis, P. A., & Van Broeckhoven, C. (1991). Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). *Neuromuscular Disorders*, *1*(2), 93–97. [https://doi.org/10.1016/0960-8966\(91\)90055-W](https://doi.org/10.1016/0960-8966(91)90055-W)
- Reilly, M. M. (2007). Sorting out the inherited neuropathies. In *Practical Neurology* (Vol. 7, Issue 2, pp. 93–105). BMJ Publishing Group Ltd.
- Reilly, M. M., Murphy, S. M., & Laurá, M. (2011). Charcot-Marie-Tooth disease. *Journal of the Peripheral Nervous System*, *16*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2011.00324.x>
- Ribiere, C., Bernardin, M., Sacconi, S., Delmont, E., Fournier-Mehouas, M., Rauscent, H., Benchortane, M.,

- Staccini, P., Lantéri-Minet, M., & Desnuelle, C. (2012). Pain assessment in Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 55(3), 160–173. <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2012.02.005>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H. L., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30.Standards>
- Roa, B. B., Dyck, P. J., Marks, H. G., Chance, P. F., & Lupski, J. R. (1993). Dejerine–Sottas syndrome associated with point mutation in the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene. *Nature Genetics*, 5(3), 269–273. <https://doi.org/10.1038/ng1193-269>
- Rossor, A. M., Shy, M. E., & Reilly, M. M. (2020). Are we prepared for clinical trials in Charcot-Marie-Tooth disease? *Brain Research*, 1729(December 2019), 146625. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146625>
- Rossor, A. M., Evans, M. R. B., & Reilly, M. M. (2015). A practical approach to the genetic neuropathies. *Practical Neurology*, 15(3), 187–198. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2015-001095>
- Rossor, A. M., Polke, J. M., Houlden, H., & Reilly, M. M. (2013). Clinical implications of genetic advances in charcot-marie-tooth disease. *Nature Reviews Neurology*, 9(10), 562–571. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.179>
- Roussy, G., & Levy, G. (1926). Sept cas d'une maladie familiale particulière: troubles de la marche, pieds bots et aréflexie tendineuse généralisée, avec, accessoirement, légère maladresse des mains. *Rev Neurol*, 1, 427–450.
- Roussy, G., & Lévy, G. (1932). La dystasie areflexique hereditaire. *Presse Med.*, 2:1733.
- Rudnik-Schöneborn, S., Tölle, D., Senderek, J., Eggermann, K., Elbracht, M., Kornak, U., von der Hagen, M., Kirschner, J., Leube, B., Müller-Felber, W., Schara, U., von Au, K., Wiczorek, D., Bußmann, C., & Zerres, K. (2016). Diagnostic algorithms in Charcot-Marie-Tooth neuropathies: Experiences from a German genetic laboratory on the basis of 1206 index patients. *Clinical Genetics*, 89(1), 34–43. <https://doi.org/10.1111/cge.12594>
- Russo, M., Laurá, M., Polke, J. M., Davis, M. B., Blake, J., Brandner, S., Hughes, R. A. C., Houlden, H., Bennett, D. L. H., Lunn, M. P. T., & Reilly, M. M. (2011). Variable phenotypes are associated with PMP22 missense mutations. *Neuromuscular Disorders*, 21(2), 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.11.011>
- Sabéran-Djoneidi, D., Sanguedolce, V., Assouline, Z., Lévy, N., Passage, E., & Fontés, M. (2000). Molecular dissection of the Schwann cell specific promoter of the PMP22 gene. *Gene*, 248(1–2), 223–231. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00116-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00116-5)
- Sahenk, Z., & Ozes, B. (2020). Gene therapy to promote regeneration in Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain Research*, 1727(October). <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146533>
- Saifee, T. A., Pareés, I., Kassavetis, P., Kaski, D., Bronstein, A. M., Rothwell, J. C., Sadnicka, A., Lunn, M. P., Manji, H., Teo, J. T., Bhatia, K. P., Reilly, M. M., & Edwards, M. J. (2015). Tremor in Charcot-Marie-Tooth disease: No evidence of cerebellar dysfunction. *Clinical Neurophysiology*, 126(9), 1817–1824. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2014.12.023>
- Saifi, G. M., Szigeti, K., Wiszniewski, W., Shy, M. E., Krajewski, K., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Kochanski, A.,

- Reeser, S., Mancias, P., Butler, I., & Lupski, J. R. (2005). SIMPLE mutations in Charcot-Marie-Tooth disease and the potential role of its protein product in protein degradation. *Human Mutation*, *25*(4), 372–383. <https://doi.org/10.1002/humu.20153>
- Salemi, G., Fierro, B., Savettieri, G., Maggio, M., Lupo, I., Ferrari, S., & Piccoli, F. (1992). Myasthenia gravis associated with Charcot-Marie-Tooth neuropathy: report of a case. *The Italian Journal of Neurological Sciences*, *13*(5), 431–433. <https://doi.org/10.1007/BF02312150>
- Sanmaneechai, O., Feely, S., Scherer, S. S., Herrmann, D. N., Burns, J., Muntoni, F., Li, J., Siskind, C. E., Day, J. W., Laura, M., Sumner, C. J., Lloyd, T. E., Ramchandren, S., Shy, R. R., Grider, T., Bacon, C., Finkel, R. S., Yum, S. W., Moroni, I., ... Shy, M. E. (2015). Genotype-phenotype characteristics and baseline natural history of heritable neuropathies caused by mutations in the MPZ gene. *Brain*, *138*(11), 3180–3192. <https://doi.org/10.1093/brain/awv241>
- Saporta, A. S. D., Sottile, S. L., Miller, L. J., Shawna, M. E., Siskind, C. E., & Shy, M. E. (2011). Charcot Marie Tooth (CMT) Subtypes and Genetic Testing Strategies. *Annals of Neurology*, *69*(1), 22–33. <https://doi.org/10.1002/ana.22166>.
- Saporta, M. A. (2014). Charcot-Marie-Tooth Disease and Other Inherited Neuropathies. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, *20*(5), 1208–1225. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000455885.37169.4c>
- Senderek, J., Bergmann, C., Ramaekers, V. T., Nelis, E., Bernert, G., Makowski, A., Züchner, S., De Jonghe, P., Rudnik-Schöneborn, S., Zerres, K., & Schröder, J. M. (2003). Mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 (GDAP1) gene in intermediate type autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain*, *126*(3), 642–649. <https://doi.org/10.1093/brain/awg068>
- Senderek, J., Bergmann, C., Stendel, C., Kirfel, J., Verpoorten, N., De Jonghe, P., Timmerman, V., Chrast, R., Verheijen, M. H. G., Lemke, G., Battaloglu, E., Parman, Y., Erdem, S., Tan, E., Topaloglu, H., Hahn, A., Müller-Felber, W., Rizzuto, N., Fabrizi, G. M., ... Zerres, K. (2003). Mutations in a Gene Encoding a Novel SH3/TPR Domain Protein Cause Autosomal Recessive Charcot-Marie-Tooth Type 4C Neuropathy. *American Journal of Human Genetics*, *73*(5), 1106–1119. <https://doi.org/10.1086/379525>
- Senderek, J., Lassuthova, P., Kabzińska, D., Abreu, L., Baets, J., Beetz, C., Braathen, G. J., Brenner, D., Dalton, J., Dankwa, L., Deconinck, T., De Jonghe, P., Dräger, B., Eggermann, K., Ellis, M., Fischer, C., Stojkovic, T., Herrmann, D. N., Horvath, R., ... Auer-Grumbach, M. (2020). The genetic landscape of axonal neuropathies in the middle-aged and elderly: Focus on MME. *Neurology*, *95*(24), e3163–e3179. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000011132>
- Sereda, M. W., Meyer Zu Hörste, G., Suter, U., Uzma, N., & Nave, K. A. (2003). Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nature Medicine*, *9*(12), 1533–1537. <https://doi.org/10.1038/nm957>
- Sevilla, T., Jaijo, T., Nauffal, D., Collado, D., Chumillas, M. J., Vilchez, J. J., Muelas, N., Bataller, L., Domenech, R., Espinos, C., & Palau, F. (2008). Vocal cord paresis and diaphragmatic dysfunction are severe and frequent symptoms of GDAP1-associated neuropathy. *Brain*, *131*(11), 3051–3061. <https://doi.org/10.1093/brain/awn228>
- Sevilla, T., Martínez-Rubio, D., Márquez, C., Paradás, C., Colomer, J., Jaijo, T., Millán, J. M., Palau, F., & Espinós, C. (2013). Genetics of the Charcot-Marie-Tooth disease in the Spanish Gypsy population: The hereditary motor and sensory neuropathy-Russe in depth. *Clinical Genetics*, *83*(6), 565–570. <https://doi.org/10.1111/cge.12015>

- Shy, M. E. (2006). Peripheral neuropathies caused by mutations in the myelin protein zero. *Journal of the Neurological Sciences*, *242*(1-2 SPEC. ISS.), 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2005.11.015>
- Shy, M. E., Chen, L., Swan, E. R., Taube, R., Krajewski, K. M., Herrmann, D., Lewis, R. A., & McDermott, M. P. (2008a). Neuropathy progression in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Neurology*, *70*(5), 378–383. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000297553.36441.ce>
- Shy, M. E., Jáni, A., Krajewski, K., Grandis, M., Lewis, R. A., Li, J., Shy, R. R., Balsamo, J., Lilien, J., Garbern, J. Y., & Kamholz, J. (2004). Phenotypic clustering in MPZ mutations. *Brain*, *127*(2), 371–384. <https://doi.org/10.1093/brain/awh048>
- Shy, M. E., Lupsky, J. R., Chance, P. F., Klein, C. J., & Dyck, P. J. (2005). Hereditary Motor and Sensory Neuropathies: An Overview of Clinical, Genetic, Electrophysiologic, and Pathologic Features. In *Peripheral Neuropathy* (pp. 1623–1658). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7216-9491-7.50072-7>
- Siskind, C. E., Murphy, S. M., Ovens, R., Polke, J., Reilly, M. M., & Shy, M. E. (2011). Phenotype expression in women with CMT1X. *Journal of the Peripheral Nervous System*, *16*(2), 102–107. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2011.00332.x>
- Siskind, C. E., & Shy, M. E. (2011). Genetics of neuropathies. *Seminars in Neurology*, *31*(5), 494–505. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1299788>
- Sivera, R., Frasquet, M., Lupo, V., Garcíá-Sobrino, T., Blanco-Arias, P., Pardo, J., Fernández-Torrón, R., De Munain, A. L., Márquez-Infante, C., Villarreal, L., Carbonell, P., Rojas-García, R., Segovia, S., Illa, I., Frongia, A. L., Nascimento, A., Ortez, C., Garcíá-Romero, M. D. M., Pascual, S. I., ... Sevilla, T. (2017). Distribution and genotype-phenotype correlation of GDAP1 mutations in Spain. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06894-6>
- Sivera, R., Sevilla, T., Vilchez, J. J., Martínez-Rubio, D., Chumillas, M. J., Vazquez, J. F., Muelas, N., Bataller, L., Millan, J. M., Palau, F., & Espinos, C. (2013). Charcot-Marie-Tooth disease: Genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. *Neurology*, *81*(18), 1617–1625. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a9f56a>
- Skre, H. (1974). Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clinical Genetics*, *6*(2), 98–118. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4430158>
- Smith, J. L. (1985). Myasthenia gravis and charcot-marie-tooth disease. In *Journal of Clinical Neuro-Ophthalmology* (Vol. 5, Issue 2, pp. 73–75).
- Spector, R. H., Smith, J. L., & Chavis, P. S. (1978). Charcot-Marie-Tooth Disease mimicking ocular Myasthenia gravis. *Annals of Ophthalmology*, *10*(8), 1033–1036.
- Street, V. A., Bennett, C. L., Goldy, J. D., Shirk, A. J., Kleopa, K. A., Tempel, B. L., Lipe, H. P., Scherer, S. S., Bird, T. D., & Chance, P. F. (2003). Mutation of a putative protein degradation gene LITAF/SIMPLE in Charcot-Marie-Tooth disease 1C. *Neurology*, *60*(1), 22–26. <https://doi.org/10.1212/WNL.60.1.22>
- Street, V. A., Goldy, J. D., Golden, A. S., Tempel, B. L., Bird, T. D., & Chance, P. F. (2002). Mapping of Charcot-Marie-Tooth disease type 1C to chromosome 16p identifies a novel locus for demyelinating neuropathies. *American Journal of Human Genetics*, *70*(1), 244–250. <https://doi.org/10.1086/337943>
- Suter, U., Welcher, A. A., Özcelik, T., Snipes, G. J., Kosaras, B., Francke, U., Billings-Gagliardi, S., Sidman, R. L., & Shooter, E. M. (1992). Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene. *Nature*, *356*(6366), 241–244. <https://doi.org/10.1038/356241a0>

- Taioli, F., Cabrini, I., Cavallaro, T., Acler, M., & Fabrizi, G. M. (2011). Inherited demyelinating neuropathies with micromutations of peripheral myelin protein 22 gene. *Brain*, *134*(2), 608–617. <https://doi.org/10.1093/brain/awq374>
- Tazir, M., Hamadouche, T., Nouioua, S., Mathis, S., & Vallat, J. M. (2014). Hereditary motor and sensory neuropathies or Charcot-Marie-Tooth diseases: An update. *Journal of the Neurological Sciences*, *347*(1–2), 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.10.013>
- Thomas, P. K., Lascelles, R. G., & Stewart, G. (1975). Hypertrophic neuropathy. In V. PJ & B. GW (Eds.), *Handbook of clinical neurology* (pp. 825–867).
- Thomas, P. K., Marques, W., Davis, M. B., Sweeney, M. G., King, R. H., Bradley, J. L., Muddle, J. R., Tyson, J., Malcolm, S., & Harding, A. E. (1997). The phenotypic manifestations of chromosome 17p11.2 duplication. *Brain : A Journal of Neurology*, *120* ( Pt 3), 465–478. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9126058>
- Timmerman, V., Strickland, A. V., & Züchner, S. (2014). Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease within the frame of the human genome project success. In *Genes* (Vol. 5, Issue 1, pp. 13–32). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/genes5010013>
- Tooth, H. H. (1886). *The peroneal type of progressive muscular atrophy* [University of Cambridge]. <https://collections.nlm.nih.gov/catalog/nlm:nlmuid-100899256-bk>
- Ursino, G., Alberti, M. A., Grandis, M., Reni, L., Pareyson, D., Bellone, E., Gemelli, C., Sabatelli, M., Pisciotta, C., Luigetti, M., Santoro, L., Massollo, L., & Schenone, A. (2013). Influence of comorbidities on the phenotype of patients affected by Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1A. *Neuromuscular Disorders*, *23*(11), 902–906. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2013.07.002>
- Vaeth, S., Vaeth, M., Andersen, H., Christensen, R., & Jensen, U. B. (2017). Charcot-Marie-Tooth disease in Denmark: A nationwide register-based study of mortality, prevalence and incidence. *BMJ Open*, *7*(11), 1–7. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-018048>
- Vance, J. M., Nicholson, G. A., Yamaoka, L. H., Stajich, J., Stewart, C. S., Speer, M. C., Hung, W. Y., Roses, A. D., Barker, D., & Pericak-Vance, M. A. (1989). Linkage of Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a to chromosome 17. *Experimental Neurology*, *104*(2), 186–189. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(89\)80013-5](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(89)80013-5)
- Verhamme, C., van Schaik, I. N., Koelman, J. H. T. M., de Haan, R. J., & de Visser, M. (2009). The natural history of Charcot-Marie-Tooth type 1A in adults: a 5-year follow-up study. *Brain*, *132*(12), 3252–3262. <https://doi.org/10.1093/brain/awp251>
- Verhamme, C., de Haan, R. J., Vermeulen, M., Baas, F., de Visser, M., & van Schaik, I. N. (2009). Oral high dose ascorbic acid treatment for one year in young CMT1A patients: A randomised, double-blind, placebo-controlled phase II trial. *BMC Medicine*, *7*. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-7-70>
- Verhoeven, K., Claeys, K. G., Züchner, S., Schröder, J. M., Weis, J., Ceuterick, C., Jordanova, A., Nelis, E., De Vriendt, E., Van Hul, M., Seeman, P., Mazanec, R., Saifi, G. M., Szigeti, K., Mancias, P., Butler, I. J., Kochanski, A., Ryniewicz, B., De Bleecker, J., ... Timmerman, V. (2006). MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain*, *129*(8), 2093–2102. <https://doi.org/10.1093/brain/awl126>
- Virchow, A. (1855). Ein Fall von progressiver Muskelatrophie. *Arch Pathol Anat*, *8*, 537–540.
- Vucic, S., Kennerson, M., Zhu, D., Miedema, E., Kok, C., & Nicholson, G. A. (2003). CMT with pyramidal features.

- Neurology*, 60(4), 696–699. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000048561.61921.71>
- Wallace, A., Pietrusz, A., Dewar, E., Dudzic, M., Jones, K., Hennis, P., Sterr, A., Baio, G., Machado, P. M., Laurá, M., Skorupinska, I., Skorupinska, M., Butcher, K., Trenell, M., Reilly, M. M., Hanna, M. G., & Ramdharry, G. M. (2019). Community exercise is feasible for neuromuscular diseases and can improve aerobic capacity. *Neurology*, 92(15), e1773–e1785. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000007265>
- Walsh, M., Bell, K. M., Chong, B., Creed, E., Brett, G. R., Pope, K., Thorne, N. P., Sadedin, S., Georgeson, P., Phelan, D. G., Day, T., Taylor, J. A., Sexton, A., Lockhart, P. J., Kiers, L., Fahey, M., Macciocca, I., Gaff, C. L., Oshlack, A., ... Ryan, M. M. (2017). Diagnostic and cost utility of whole exome sequencing in peripheral neuropathy. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 4(5), 318–325. <https://doi.org/10.1002/acn3.409>
- Wang, W., Wang, C., Brian Dawson, D., Thorland, E. C., Lundquist, P. A., Eckloff, B. W., Wu, Y., Baheti, S., Evans, J. M., Scherer, S. S., Dyck, P. J., & Klein, C. J. (2016). Target-enrichment sequencing and copy number evaluation in inherited polyneuropathy. *Neurology*, 86(19), 1762–1771. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002659>
- Wang, Y., & Yin, F. (2016). A Review of X-linked Charcot-Marie-Tooth Disease. *Journal of Child Neurology*, 31(6), 761–772. <https://doi.org/10.1177/0883073815604227>
- Warner, L. E., Mancias, P., Butler, I. J., McDonald, C. M., Keppen, L., Koob, K. G., & Lupski, J. R. (1998). Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nature Genetics*, 18(4), 382–384. <https://doi.org/10.1038/ng0498-382>
- Warner, L. E., Svaren, J., Milbrandt, J., & Lupski, J. R. (1999). Functional consequences of mutations in the early growth response 2 gene (EGR2) correlate with severity of human myelinopathies. *Human Molecular Genetics*, 8(7), 1245–1251. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.7.1245>
- Wilson, T. E., Day, M. L., Pexton, T., Padgett, K. A., Johnston, M., & Milbrandt, J. (1992). In vivo mutational analysis of the NGFI-A zinc fingers. *Journal of Biological Chemistry*, 267(6), 3718–3724. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)50584-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)50584-1)
- Yang Yaping, M. D. M., Xia, F., Niu, Z., Person, R., Veeraraghavan, N., Hawes, A., & Chiang, T. (2014). Molecular Findings Among Patients Referred for Clinical Whole-Exome Sequencing. *JAMA*, 312(18), 1870–1879. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.14601.Molecular>
- Yang Yi, G. L. Q., Burnette, W. B., & Li, J. (2016). N98S mutation in NEFL gene is dominantly inherited with a phenotype of polyneuropathy and cerebellar atrophy. *Journal of the Neurological Sciences*, 365, 46–47. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.04.007>
- Yiu, E. M., Burns, J., Ryan, M. M., & Ouvrier, R. A. (2008). Neurophysiologic abnormalities in children with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 13(3), 236–241. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2008.00182.x>
- Yum, S. W., Zhang, J., Mo, K., Li, J., & Scherer, S. S. (2009). A novel recessive *Nefl* mutation causes a severe, early-onset axonal neuropathy. *Annals of Neurology*, 66(6), 759–770. <https://doi.org/10.1002/ana.21728>
- Zhao, H. T., Damle, S., Ikeda-Lee, K., Kuntz, S., Li, J., Mohan, A., Kim, A., Hung, G., Scheideler, M. A., Scherer, S. S., Svaren, J., Swayze, E. E., & Kordasiewicz, H. B. (2018). PMP22 antisense oligonucleotides reverse Charcot-Marie-Tooth disease type 1A features in rodent models. *Journal of Clinical Investigation*, 128(1), 359–368. <https://doi.org/10.1172/JCI96499>

- Zhu, D., Kennerson, M. L., Walizada, G., Zuchner, S., Vance, J. M., & Nicholson, G. A. (2005). Charcot-Marie-Tooth with pyramidal signs is genetically heterogeneous: Families with and without MFN2 mutations. *Neurology*, *65*(3), 496–497. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000171345.62270.29>
- Zimorí, M., Battaloğlu, E., Parman, Y., Erdem, S., Baets, J., Vriendt, E. De, Atkinson, D., Almeida-Souza, L., Deconinck, T., Ozes, B., Goossens, D., Cirak, S., Damme, P. Van, Shboul, M., Voit, T., Maldergem, L. Van, Dan, B., El-Khateeb, M. S., Guergueltcheva, V., ... Jordanova, A. (2015). Unraveling the genetic landscape of autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathies using a homozygosity mapping approach. *Neurogenetics*, *16*(1), 33. <https://doi.org/10.1007/S10048-014-0422-0>
- Zu Horste, G. M., Prukop, T., Liebetanz, D., Mobius, W., Nave, K. A., & Sereda, M. W. (2007). Antiprogestosterone therapy uncouples axonal loss from demyelination in a transgenic rat model of CMT1A neuropathy. *Annals of Neurology*, *61*(1), 61–72. <https://doi.org/10.1002/ana.21026>

**ANEXO**



## A novel EGR2 variant that associates with CMT disease when combined with LITAF T49M polymorphism

Maria Empar Blanco-Cantó MD <sup>\*1</sup>, Nikiben Patel MSc <sup>\*1,2</sup>, Sergio Velasco-Aviles MSc<sup>1,2</sup>, Angeles Casillas-Bajo BSc <sup>1,2</sup>, Juan Salas-Felipe MD<sup>3</sup>, Alexandre García-Escrivá MD, Carmen Díaz-Marín MD PhD<sup>1§</sup> and Hugo Cabedo MD PhD<sup>1,2,§</sup>

<sup>1</sup>ISABIAL (FISABIO), Hospital General Universitario de Alicante, Alicante 03010, Spain

<sup>2</sup>Instituto de Neurociencias de Alicante UMH-CSIC, San Juan de Alicante 03550, Spain

<sup>3</sup>Hospital Marina Salud, Denia 03700, Spain

<sup>4</sup>Hospital IMED Levante, Benidorm 03503, Spain

\*These authors contributed equally to this work.

§ Correspondence: [hugo.cabedo@umh.es](mailto:hugo.cabedo@umh.es)

[carmina.diaz.marin@gmail.com](mailto:carmina.diaz.marin@gmail.com)

Phone 0034965919356

Fax 0034965919561

### ABSTRACT

#### Objective

To identify novel genetic mechanisms causing Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease.

#### Methods

We performed a next-generation sequencing study of 34 genes associated with CMT in a patient with peripheral neuropathy.

#### Results

We found a non-previously described mutation in EGR2 (p.P397H). P397H mutation is located within the loop that connects zinc fingers 2 and 3, a pivotal domain for the activity of this transcription factor. Using promoter activity luciferase assays, we found that this mutation promotes decreased transcriptional

activity of EGR2. In this patient, we also found a previously described nonpathogenic polymorphism in lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  factor (LITAF) (p.T49M). We show that the p.T49M mutation decreases the steady-state levels of the LITAF protein in Schwann cells. Loss of function of LITAF has been shown to produce deregulation in the NRG1-erbB signaling, a pivotal pathway for EGR2 expression by Schwann cells. Surprisingly, our segregation study demonstrates that p.P397H mutation in EGR2 is not sufficient to produce CMT disease. Most notably, only those patients expressing simultaneously the LITAF T49M polymorphism develop peripheral neuropathy.

## Conclusions

Our data support that the LITAF loss-of-function interferes with the expression of the transcriptional-deficient EGR2 P397H mutant hampering Schwann cell differentiation and suggest that in vivo both genes act in tandem to allow the proper development of myelin.

## GLOSARY

ChIP: chromatin immunoprecipitation; CMT: Charcot-Marie-Tooth; CMTNS: CMT neuropathy score; LITAF: lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  factor.

## INTRODUCTION

Many genes responsible for Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease have been identified to date, and it has been estimated that at least other 30 CMT-causing genes could be still discovered in the near future.<sup>1-3</sup> EGR2 (also known as KROX20) is a transcription factor that activates the myelination program in Schwann cells.<sup>4,5</sup> Different alterations in the zinc finger region of this transcription factor lead to demyelination causing the autosomal dominant CMT1 type D.<sup>6</sup> The lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  factor (LITAF) is an 18-kDa protein involved in endosomal recycling and protein degradation. Eight missense mutations in the *LITAF* gene have been associated with autosomal dominant CMT1 type C.<sup>7</sup> Although some of these mutations cause mislocation of LITAF from the lysosomal membrane to the cytosol and others induce the formation of aggresomes,<sup>8,9</sup> the exact pathogenic mechanism inducing demyelination remains unknown. Here, we describe a family with a novel mutation in EGR2 (EGR2 P397H). Although the mutation reduces the capacity of this transcription factor to induce myelin gene expression in vitro, in human heterozygotes, this apparently produces no changes in myelin development and nerve function. Of interest, those

members of the family who also harbor a nonpathogenic very-low-frequency polymorphism (<0.001) in LITAF (LITAF T49M)<sup>10</sup> developed a full-blown clinical pattern of inherited demyelinating peripheral polyneuropathy. Our data suggest that in these patients, a mild reduction in the function of the LITAF T49M protein can interfere with intracellular signaling and decrease the expression of an already transcriptionally deficient EGR2 P397H, hampering myelin development and nerve function.

## METHODS

### Family selection

We selected a white family from the southwest region of Spain without consanguinity (figure 1). In this family, the proband patient and her father had an intermediate hereditary motor and sensory neuropathy.

### Next-generation sequencing and analyses

We extracted DNA from blood and then performed next-generation sequencing of a panel of 34 genes correlated with Charcot-Marie-Tooth disease (table e-1, [links.lww.com/NXG/A244](https://links.lww.com/NXG/A244)). The regions under study were selected by hybridization including exons and adjacent intron regions (−8, +8) of the panel genes. Clonal amplification and sequencing was performed using a paired-end strategy on the Illumina MiSeq platform. Sanger sequencing was accomplished for relevant detected changes and in silico predictive analyses for missense mutations through the Alamut program. We screened variants' frequencies at the Inherited Neuropathy Variant Browser ([http://hihg.med.miami.edu/code/http/cmt/public\\_html/index.html#/](http://hihg.med.miami.edu/code/http/cmt/public_html/index.html#/)).

**Plasmids.** pGFP-hLITAF and pEGFP-hLITAF T49M were provided by Dr. Philip Woodman and Dr. Lydia Wunderley (University of Manchester, UK). Where necessary, the DNA encoding for green fluorescent protein (GFP) was removed with restriction enzymes using standard molecular biology cloning methods to generate pHLITAF and pHLITAF T49M. A PMP22 intronic enhancer cloned in pGL4 (pHPMP22enh-Luciferase) and pcDNA3.1 hEGR2 construct were provided by Dr. John Svaren (University of Wisconsin). pcDNA3.1-EGR2 P397H was generated with the Quikchange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). The correct sequences of the construct were confirmed by sequencing.

**Cell cultures.** Schwann cells were cultured from sciatic nerves of neonatal rats as described previously<sup>11</sup> with minor modifications (see Methods, e-Methods, [links.lww.com/NXG/A245](https://links.lww.com/NXG/A245)). RT4D6-P2T rat Schwannoma cells were obtained from Professor Dies Meijer (University of Edinburgh, UK). HEK293 cells were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

**Reporter activity assays.** Schwann cells or HEK293 cells were transfected with the indicated constructs and then lysed. Their luciferase activity was determined with the Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI) using the manufacturer's recommendations. The  $\beta$ -galactosidase activity (Beta-Glo Assay System; Promega) of a pRSV40-LacZ reporter cotransfected at 1:100 was used to normalize variations in cell number, viability, and transfection efficiency.

**Immunofluorescence.** Immunofluorescence studies were performed on cells cultured in coverslips using standard procedures (see Methods, e-Methods, [links.lww.com/NXG/A245](https://links.lww.com/NXG/A245)).

**Chromatin immunoprecipitation assays.** The chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay followed a modified procedure of the method<sup>12</sup> (see Methods, e-Methods, [links.lww.com/NXG/A245](https://links.lww.com/NXG/A245)).

**DNA-protein binding assay.** The binding of EGR2 to DNA was performed using the DNA-Protein Binding Assay Kit from Abcam (ab117139) (see Methods, e-Methods, [links.lww.com/NXG/A245](https://links.lww.com/NXG/A245)).

### **Standard protocol approvals, registrations, and patient consents**

Human DNA was obtained using protocols approved by our institutional review board. The research was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. The Ethical Committee of the General Hospital of Alicante approved the study. All adult participants provided informed consent for clinical and genetic analysis.

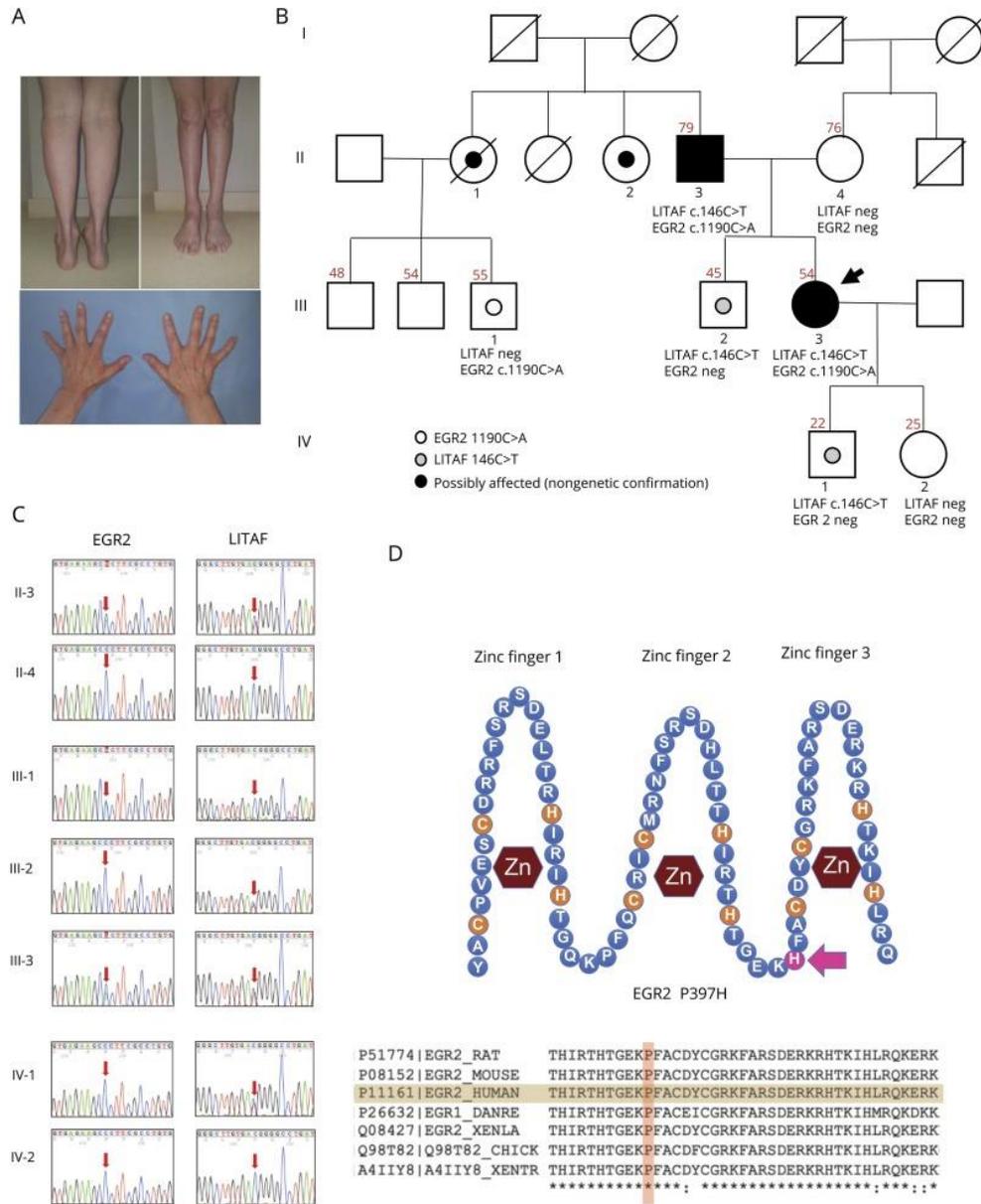
### **Statistical analysis**

Values are presented as mean  $\pm$  standard error among comparison groups, and statistical significance of group differences was estimated with the Student *t* test. A critical *p* value of less than 0.05 was considered significant. Analysis was performed using GraphPad software (version 6.0).

**Data availability**

The data that support the study findings are available from the corresponding authors on reasonable request.

**Figure 1.** Segregation of EGR2 P397H and LITAF T49M mutations in the family



(A) Images obtained from the proband (III.3) showing atrophy of the posterior leg muscle compartment that generates lower limbs in inverted champagne bottle. In the upper

limbs, hand muscles and thenar eminence were also atrophied. (B) Family pedigree. Ages at the moment of exploration are indicated in red. The arrow indicates the proband. LITAF neg, EGR neg: tested for mutations with negative results. (C) Chromatograms of members of the family. A red arrow indicates the position of the potentially mutated nucleotide. (D) Cartoon showing the localization of the newly identified mutation in the loop connecting zinc fingers 2 and 3 of the EGR2 transcription factor (arrow in the upper image). The alignment of the equivalent region of EGR2 from 7 different species shows that this is a highly evolutionary conserved sequence (lower image). LITAF = lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  factor.

## RESULTS

### Clinical studies of the proband

The proband (III.3 in figure 1B) was a 54-year-old woman with an intermediate hereditary motor and sensory neuropathy, with chronic axonal damage diagnosed at age 47 years in a neurophysiologic study. Initial symptoms began in the early childhood with progressive muscular atrophy and gait instability. At the most recent examination in April 2018 (figure 1A), the distal upper and lower limbs showed moderate-severe atrophy with associated weakness, arched feet, and Achilles tendon shortening. Reflexes were decreased or abolished. All sensory modalities were diminished. The CMT neuropathy score (CMTNS)<sup>13</sup> value was 20. In the neurophysiologic study, motor nerve conduction velocities were slightly decreased in the median nerve, and no compound action potentials could be detected in the lower limbs (peroneal and tibial nerves) (table 1). Sensory nerve conduction velocities were decreased in the median and sural nerves, and action potentials were undetectable in the peroneal nerve.

### Genetic study of the proband

The proband (III.3 in figure 1B) underwent a detailed genetic study to identify the mutated gene that was putatively responsible for the disease. After ruling out *PMP22* duplication, 34 candidate genes (table e-1, [links.lww.com/NXG/A244](https://links.lww.com/NXG/A244)) associated with CMT disease were selected for next-generation sequencing. No previously described pathogenic mutations were found in any of these genes. However, the patient

shows a previously described variant of the *LITAF* gene (c.146C>T; p.Thr49Met), considered to be a polymorphism, as it has been found in both symptomatic and nonsymptomatic individuals<sup>7,10</sup> (figure 1, B and C). This variant is predicted to produce the change of threonine 49 by a methionine in the *LITAF* polypeptide (*LITAF* T49M). Of interest, the proband also demonstrated a previously undescribed missense mutation in *EGR2* (c.1190C>A; p.Pro397His) (figure 1, B and C). This nucleotide substitution is predicted to produce a change of the proline 397 by a histidine (*EGR2* P397H) within the loop sequence that connects zinc finger numbers 2 and 3 (figure 1D). The presence of both mutations in heterozygosis was confirmed by amplifying the proband's genomic DNA by PCR and sequencing with the Sanger method (III.3 in figure 1C).

**Table 1.** Electrophysiologic findings of the proband (III-3), father (II-3), brother (III-2), and cousin (III-1)

	Proband III-3	II-3	III-3	III-1
<b>Motor nerve conduction</b>				
<b>Median nerve</b>				
Distal latency (ms) (<4.2)	<b>4.40</b>	<b>4.75</b>	2.85	3.9
CMAP (mV) (>3.5)	4.9	3.5	5.6	6.5
MCV (m/s) (>48)	<b>45.4</b>	<b>44.5</b>	54.4	49.3
<b>Ulnar nerve</b>				
Distal latency (ms) (<3.4)	3.05	<b>2.1</b>	2.65	3.3
CMAP (mV) (>2.8)	5.0	6.6	6.4	6.3
MCV (m/s) (>50)	<b>47.8</b>	59.4	Normal	Normal
<b>Peroneal nerve</b>				
Distal latency (ms) (<5.5)	NR	NR	4.1	Normal
CMAP (mV) (>2.5)	NR	NR	5.8	Normal
MCV (m/s) (>40)	NR	<b>14.8</b>	57.1	Normal
<b>Tibial nerve</b>				
Distal latency (ms) (<6.0)	NR	<b>8.05</b>	3.65	5.0
CMAP (mV) (>2.9)	NR	<b>0.1</b>	<b>2.0</b>	4.1
MCV (m/s) (>41)	NR	NR	<b>30.9</b>	41.2
<b>Sensory nerve conduction</b>				
<b>Median nerve</b>				
SNAP ( $\mu$ V) (>19)	<b>5.8</b>	<b>3.7</b>	39.6	Normal
SCV (m/s) (>47)	<b>43.0</b>	<b>29.8</b>	51.4	<b>Decreased</b>
<b>Ulnar nerve</b>				
SNAP ( $\mu$ V) (>18)	<b>4.2</b>	<b>5.8</b>	24.8	Normal
SCV (m/s) (>44)	<b>36.6</b>	<b>42.6</b>	48.8	Normal
<b>Peroneal nerve</b>				
SNAP ( $\mu$ V) (>3.5)	NR	<b>1.2</b>	4.6	3.9
SCV (m/s) (>40)	NR	<b>26.7</b>	52.9	<b>36.5</b>
<b>Sural nerve</b>				
SNAP ( $\mu$ V) (>4.9)	<b>4.8</b>	<b>0.43</b>	6.5	5.4
SCV (m/s) (>41.3)	<b>33.8</b>	<b>25.6</b>	47.9	41.7

Abbreviations: CMAP = compound muscle action potential; HMSN = hereditary sensory and motor neuropathy; MCV = motor conduction velocity; NR = nonrecordable; SCV = sensory conduction velocity; SNAP = sensory nerve action potential. Abnormal values are written in bold. Precise data for the peroneal and median nerve for patient III-1 were not available. The nerve conduction velocities and amplitudes were predominantly more decreased in the lower than in the upper limbs, with peroneal and sural nerve severe injury in the proband and her father. Peroneal nerve motor and sensory conduction velocities were NR for the proband. Tibial nerve motor conduction velocity was NR for the proband (III-3) and her father (II-3). Proband III-3 had motor tibial nerve damaged with a prevailing axonal pattern. The proband's cousin (patient III-1) showed a selective sensory peroneal and right median nerve conduction velocity decline without HMSN complete criteria.

***EGR2* (c.1190C>A; p.Pro397His) associates with CMT disease only in a *LITAF* (c.146C>T; p.Thr49Met) genetic background**

To determine whether the *EGR2* P397H mutation is associated with the disease, we performed a cosegregation study of this mutation with CMT symptoms in other members of the family. The proband's father, aged 79 years (II.3 in figure 1B), referred instability, falls, and distal paresthesia for about 20 years. Our neurologic examination showed hand interosseous and distal lower limb atrophy with almost normal muscle strength. Reflexes were decreased in the legs, and arched feet were also observed. Electrodiagnostic study demonstrated a chronic intermediate sensory and motor polyneuropathy, with predominance in the lower limbs (table 1). The CMTNS value was 9, indicating a mild disability.

*EGR2* (c.1190C>A; p.Pro397His) was found in heterozygosis in the father, suggesting an association of the mutation with the symptoms. However, he also expresses the *LITAF* T49M variant, precluding the possibility of establishing an unequivocal association between the *EGR* P397H mutation and the CMT symptoms. The proband's mother (II.4 in figure 1, B and C) does not have these mutations in *EGR2* and *LITAF* genes.

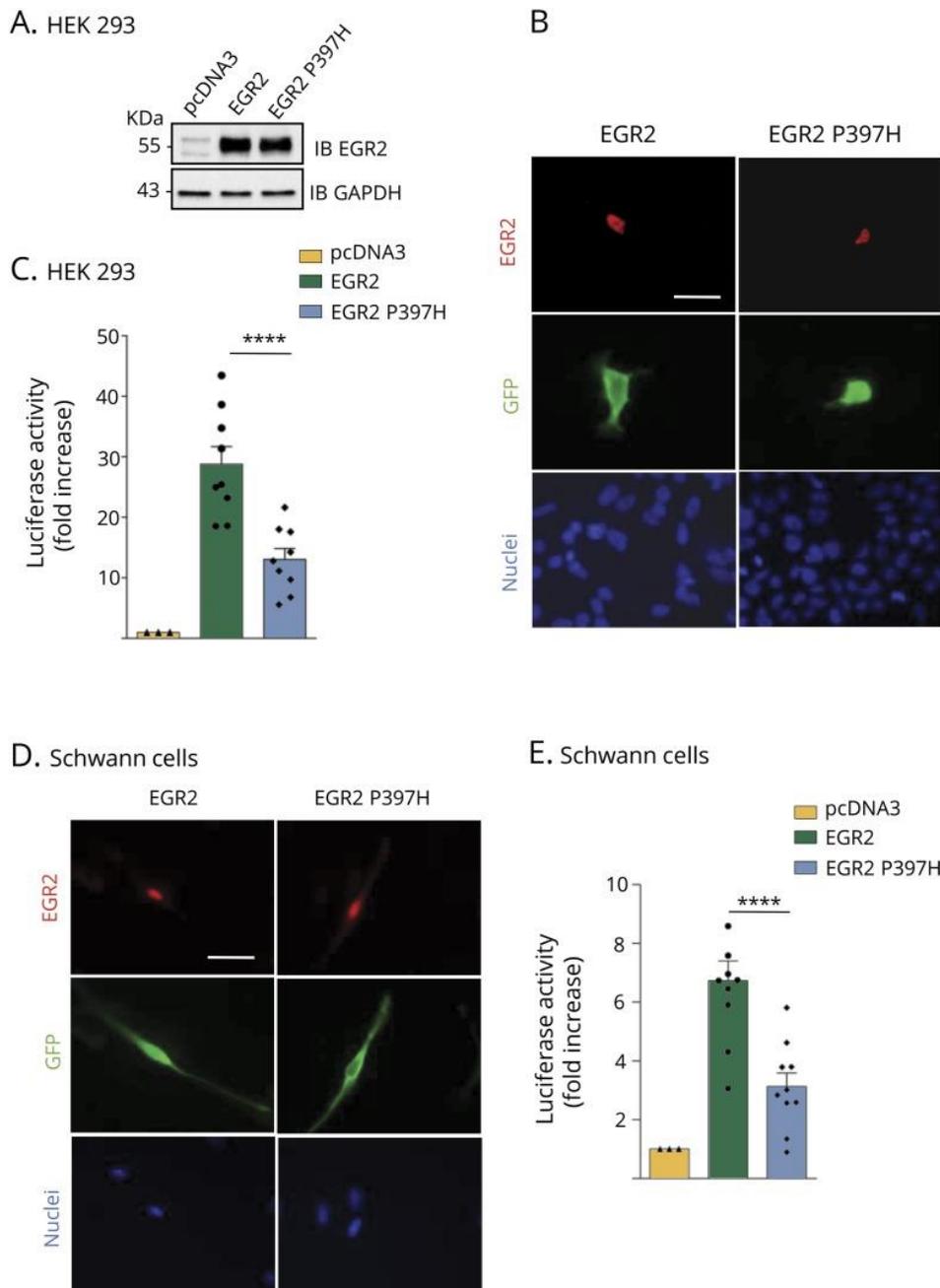
The proband's brother (III.2 in figure 1B) was aged 45 years. His neurologic examination showed slight lower distal limb atrophy, flat feet, and Achilles tendon retraction. Nerve conduction velocity studies revealed a selective motor axonal neuropathy in both tibial nerves without data of complete polyneuropathy (table 1). Genetic studies showed the *LITAF* T49M variant (in heterozygosis) but no mutation in the *EGR2* gene (figure 1C). The son (IV.1 in figure 1, B and C) showed the *LITAF* T49M in heterozygosis but was asymptomatic and neurologically normal. The daughter (IV.2 in figure 1, B and C) was also asymptomatic and did not show any of these mutations. Next, we explored other members of the family. Two of the proband's aunts were likely affected, but one of them (II.1 in figure 1B) died before the study, and the other (II.2 in figure 1B) did not want to participate in the study. The 55-year-old proband's cousin (III.1 in figure 1, B and C) was also examined. He had never complained of symptoms, and the neurologic examination was normal. Electrophysiology revealed an exclusively sensitive demyelinating polyneuropathy, probably due to the diabetes mellitus type 1 background (table 1). Of interest, the genetic study revealed that he had the *EGR2* P397H variant in heterozygosis but no mutation in *LITAF*. Thus far, our data showed that only those members of the family with the *EGR2* P397H and *LITAF* T49M develop CMT symptoms.

### **EGR2 P397H has a decreased transcriptional activity**

Mutations in EGR2 cause distinct forms of demyelinating peripheral neuropathies including CMT1 type D and Dejerine-Sottas neuropathy, among others.<sup>6</sup> Many of these mutations map in 1 of the 3 zinc finger domains of the transcription factor. The consequence of these mutations is generally the loss of DNA binding capacity. Although not strictly located within the zinc fingers, proline 397 is an evolutionary conserved residue located within a loop that connects zinc finger 2 with zinc finger 3 (figure 1D). Importantly, mutations in the equivalent proline (P368) in nerve growth factor induced gene A (a related zinc finger protein) block its transcriptional activity.<sup>14</sup> To learn how P397H change affects EGR2 function, we introduced this mutation in the construct pcDNA3.1 hEGR2. Seeking to determine whether the mutation alters the stability of EGR2 polypeptide, HEK293 cells were transfected with wild-type and mutant constructs. As is shown in figure 2A, both proteins were expressed at similar levels, illustrating that the mutation does not affect protein stability. Moreover, the EGR2 P397H mutant localized into the nucleus probing that the mutation does not change the subcellular localization of this transcription factor (figure 2B). Then, we evaluated the transcriptional activity of EGR2 P397H using an enhancer cloned upstream of the human P2 *PMP22* promoter sequence and the pGL4 luciferase reporter.<sup>15</sup> As is shown in figure 2C, EGR2 wild type induced luciferase activity by more than 28-fold over the basal activity (pcDNA3.1 empty vector). By contrast, the EGR2 P397H mutant increased the activity by only 13-fold.

To better approach the *in vivo* situation in the nerves of our patients, we decided to explore the transcriptional activity of the EGR2 P397H mutant in transfected primary cultures of Schwann cells. As is shown in figure 2D, EGR P397H is normally expressed and localized and has decreased transcriptional activity, including in Schwann cells as well. To determine whether the loss of transcriptional activity is caused by decreased capacity of the EGR2 P397H to bind DNA, HEK293 cells were transfected with the wild-type and mutant EGR2 and nucleus isolated (see Methods). Nuclear extracts were allowed to bind a double-stranded biotinylated oligonucleotide with a tandem-repeated EGR2-binding consensus sequence (see Methods, e-Methods, [links.lww.com/NXG/A245](https://links.lww.com/NXG/A245)). DNA-protein complexes were captured in the assay microwell and quantified colorimetrically with an anti-EGR2-specific antibody (see Methods, e-Methods, [links.lww.com/NXG/A245](https://links.lww.com/NXG/A245)). As is shown in figure 3A, both wild-type and mutant EGR2 showed similar binding capability DNA. To further confirm this result, we performed ChIP assays on the *PMP22* enhancer in transfected HEK293 cells (see Methods). As is highlighted in figure 3B, ChIP assay confirmed that the P397H mutation does not change the capacity of EGR2 to bind DNA.

**Figure 2.** EGR2 P397H shows a decreased transcriptional activity in both heterologous systems and Schwann cells.



(A) Western blot of HEK293 cells transfected with an empty vector (pcDNA3.1), pcDNA3.1 hEGR2 (EGR2), and pcDNA3.1 hEGR2 P397H (EGR2 P397H). GAPDH was used as a loading control. No change in the stability of the mutant protein is observed. (B) Immunofluorescence with anti-EGR2 antibody of HEK293 cotransfected cells with the

different EGR2 constructs and GFP demonstrate that both wild-type and mutant proteins localize properly in the nucleus (labeled with Hoechst staining). Anti-GFP immunofluorescence highlights those cells that have been transfected. Bars 25  $\mu\text{m}$ . (C) P397H decreases the transcriptional activity of EGR2. HEK293 cells were transfected with pHMP22enh-Luciferase and an empty vector (pcDNA3), EGR2 or EGR2 P397H and luciferase activity determined. Results were normalized against the activity of the pRSV40-LacZ vector. Data are given as mean  $\pm$  standard error (SE) and analyzed with the *t* test (2 sided). \*\*\*\* $p < 0.0001$ . (D) Immunofluorescence with anti-EGR2 antibody of Schwann cells cotransfected with the different EGR2 constructs and GFP showing both wild-type and mutant proteins localized in the nucleus. Anti-GFP immunofluorescence highlights transfected cells. Bars 25  $\mu\text{m}$ . (E) As in HEK293 cells, the transcriptional activity of EGR2 P397H also decreases in Schwann cells. Data are given as mean  $\pm$  SE and analyzed with the *t* test (2 sided). \*\*\*\* $p < 0.0001$ . GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GFP = green fluorescent protein; LITAF = lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  factor.

#### LITAF T49M protein has decreased stability

Initial studies postulated that LITAF itself might act as a transcription factor.<sup>8,16</sup> Indeed, recent studies have shown that LITAF has a cysteine-rich region that coordinates zinc.<sup>17,18</sup> We explored whether LITAF could positively regulate the transcription of myelin genes. To this aim, HEK293 cells were cotransfected with pHMP22enh-Luciferase and the plasmids encoding for the human LITAF sequence. As shown in figure 3C, LITAF was not able to induce the transcription of *PMP22*, neither increase the transcriptional activity of EGR2, ruling out a direct upregulation of EGR2 transcriptional activity by this protein. We also ruled out a direct physical interaction between LITAF and EGR2 proteins by coimmunoprecipitation studies (figure e-1, [links.lww.com/NXG/A243](https://links.lww.com/NXG/A243)). LITAF has been shown to participate in the recruitment of endosomal sorting complex required for transport components to endosomal membranes regulating ErbB receptor trafficking and consequently NRG1 signaling in Schwann cells.<sup>9</sup> Because NRG1 signaling is pivotal for EGR2 induction and Schwann cell differentiation,<sup>19</sup> we hypothesized that LITAF T49M may interfere with *EGR2* expression in the Schwann cells of the double heterozygotes. One possibility was that this mutation had a loss of function effect by decreasing protein stability. Of interest, during the coimmunoprecipitation studies performed in HEK cells (figure e-1, [links.lww.com/NXG/A243](https://links.lww.com/NXG/A243)), we noticed that the LITAF T49M GFP fusion protein was consistently much less expressed compared with the LITAF-

GFP wild type. To learn whether the T49H mutation affects LITAF protein stability also in Schwann cells, we transfected cultured Schwann cells with LITAF-GFP and LITAF T49M GFP constructs. As is shown in figure 3D, the number of cells expressing detectable levels of LITAF protein was notably lower when the mutant construct was transfected, suggesting decreased protein stability. To further substantiate this hypothesis, RT4D6 Schwannoma cells were transfected with the LITAF T49M GFP and the LITAF-GFP constructs. After 48 hours, cells were lysed, and protein extracts were immunoblotted with a polyclonal anti-LITAF antibody. Anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase immunoblot was used as a loading control. As is shown in figure 3E, the LITAF T49M GFP protein was less abundant than LITAF-GFP also in these cells. A similar result was obtained when the GFP tag was removed from the constructs. Together, our results show that the T49M mutation produces a decrease in the stability of the LITAF polypeptide that could interfere with NRG1-erbB signaling in Schwann cells.

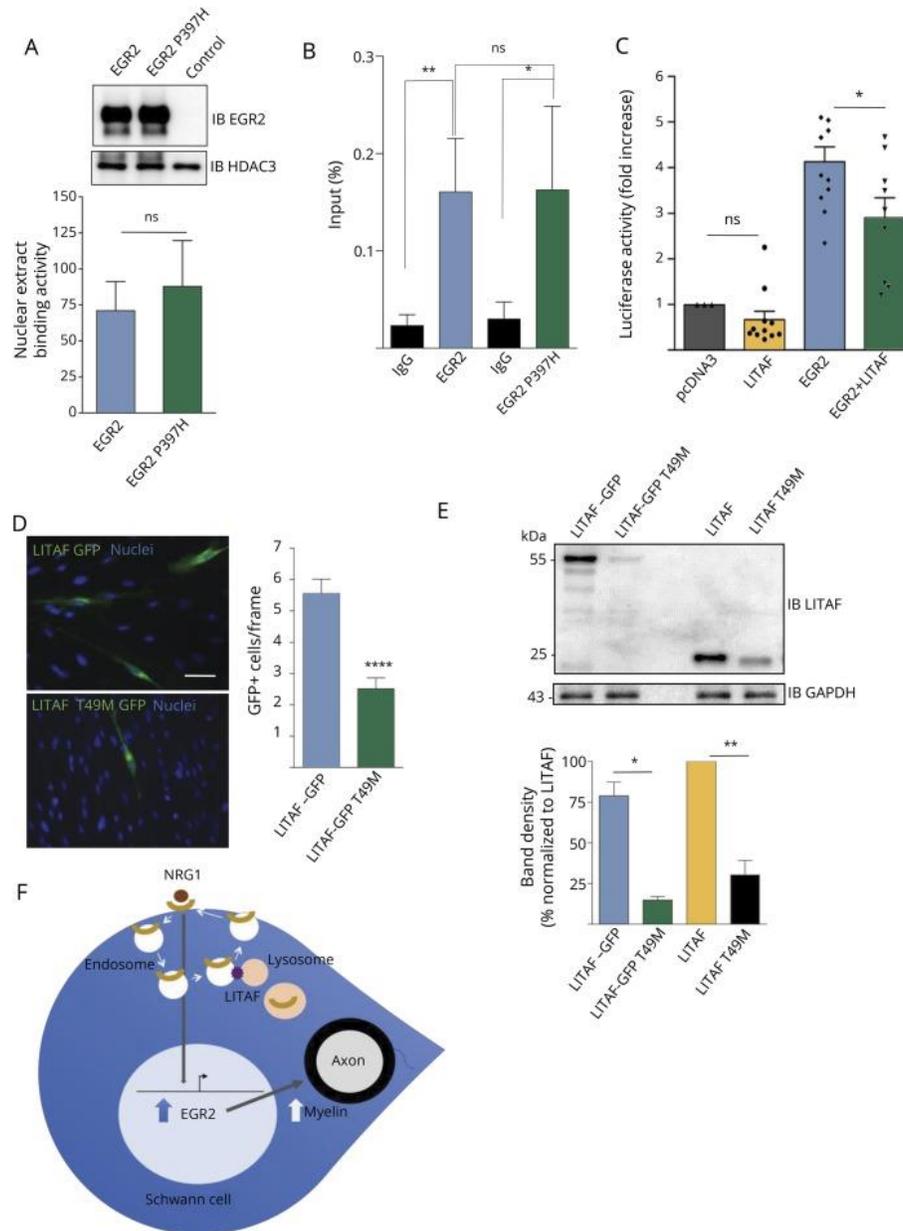
## DISCUSSION

CMT disease is a hereditary peripheral neuropathy caused by distinct mutations in more than 40 different genes. One of these genes is *EGR2*, a pivotal master gene in the establishment of the myelin gene expression program by Schwann cells.<sup>4,6,12</sup> Indeed, more than 30 missense mutations causing peripheral neuropathy have been described in this transcription factor ([http://hihg.med.miami.edu/code/http/cmt/public\\_html/index.html#/](http://hihg.med.miami.edu/code/http/cmt/public_html/index.html#/)). Most of these mutations are located in the zinc finger region, a domain essential for the transcriptional activity of *EGR2*. Using next-generation sequencing, we discovered a novel mutation of this domain in *EGR2* (*EGR2* P397H) in a family with CMT clinical symptoms. Using promoter activity assays, we found that this mutant has a decreased transcriptional activity compared with the wild type. Surprisingly, DNA binding and ChIP assays suggest that this mutant transcription factor binds efficiently to myelin gene promoters. Of interest, a similar mutation in the zinc finger transcription factor nerve growth factor induced gene A (P369) that blocks transcriptional activity does not interfere with DNA binding.<sup>14</sup> Together, these data suggest that this proline residue is involved in the recruitment of other proteins such as coactivators, but not in the binding of *EGR2* to DNA. Experiments to address this point are currently being performed in our laboratory.

We found that this family also expressed a mutation in LITAF (LITAF T49M). Although other missense mutations in this gene cause CMT type 1C disease, this particular variant has been considered a polymorphism, as it was found in asymptomatic members of other pedigrees.<sup>10</sup> Indeed, our analysis

confirms that at least 2 members of the family who present this mutation (III.2 and IV.1) have no CMT compatible clinical symptoms and are normal in the neurologic exploration.

**Figure 3.** DNA binding of EGR2 P397H, transcriptional effects of LITAF, and stability of LITAF T49M



(A) EGR2 P397H binds normally to DNA in vitro. HEK293 cells were transfected with the constructs pcDNA3.1-EGR2 and pcDNA3.1-EGR2 P397H and nuclear extracts obtained.

Biotinylated oligonucleotides with the EGR2-binding sequence in tandem (3 repeats) were incubated with nuclear extracts. Anti-EGR2 polyclonal antibody was used to quantify colorimetrically the binding of EGR2 to the oligonucleotide (see Methods). Nuclear extracts of nontransfected and GFP-transfected cells were used as controls. Data are given as mean  $\pm$  standard error (SE) and analyzed with the *t* test (2 sided). (n = 7). (B) EGR2 P397H binds normally to DNA in vivo. HEK293 cells were transfected with pcDNA3.1-EGR2 and pcDNA3.1-EGR2 P397H and cross-linked with PFA. Chromatin was purified and immunoprecipitated with anti-EGR2 antibody or a nonspecific IgG (chromatin immunoprecipitation grade). qPCR was performed with specific primers for the enhancer region of PMP22. As shown, the recovery of the PMP22 enhancer region in the immunoprecipitate was similar in both cases. No relevant recovery was obtained with the nonspecific IgG. Data are given as mean  $\pm$  SE and analyzed with the paired *t* test (2 sided). \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01 (n = 10). (C) LITAF has no PMP22 transcriptional activity and does not increase EGR2 transcriptional activity. HEK293 cells were transfected with pHMP22enh-Luciferase and an empty vector (pcDNA3), LITAF, EGR2, or LITAF + EGR2 and luciferase activity determined. Results were normalized against the activity of the pRSV40-LacZ vector. Data are given as mean  $\pm$  SE and analyzed with the *t* test (2 sided). A slight tendency to decrease the basal activity of the reporter by the LITAF construct was observed. \**p* < 0.05. (D) LITAF T49M has decreased stability. Cultured Schwann cells were transfected with LITAF-GFP and LITAF T49M GFP constructs. The number of cells expressing detectable levels of LITAF protein was notably lower with the mutant construct. Bar 25  $\mu$ m. Quantification of immunofluorescence showing the percentage of GFP positive per frame (n = 30). Data are given as mean  $\pm$  SE and analyzed with the *t* test (2 sided). (E) Immunoblot analysis supports a decreased stability for the LITAF T49M polypeptide. RT4D6 cells were transfected with the LITAF T49M GFP and the LITAF-GFP constructs, lysed, and protein extracts immunoblotted with a polyclonal anti-LITAF antibody. Anti-GAPDH immunoblot was used as a loading control. A similar result was obtained when the GFP tag was removed. The densitometry of 3 different experiments is shown. Data are given as mean  $\pm$  SE and analyzed with the *t* test (2 sided). \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01. (F) Working model: a reduction in the function of the LITAF T49M protein decreases the expression of an already transcriptionally deficient EGR2 P397H hampering myelin development and nerve function. GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GFP = green fluorescent

protein; LITAF = lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  factor; PFA = paraformaldehyde; qPCR: quantitative polymerase chain reaction.

Surprisingly, and despite of the decreased transcriptional activity of the EGR2 P397H, only those members of the family who have both mutations at the same time developed CMT symptoms (members II.3 and III.3). Indeed, the cousin of the proband (member III.1), who has only the EGR2 P397H mutation, and is of similar age, does not show CMT symptoms. Although this provides strong evidence that both mutations are necessary to develop the clinical symptoms, we cannot completely rule out that an incomplete penetrance of the EGR P397H mutation could explain our findings. Genetic and clinical characterization of other lineages will help to clarify this point.

Initially, we reasoned that a physical interaction between LITAF and EGR2 proteins could explain the genetic interaction. However, we could not detect any binding of LITAF to EGR2, neither a positive effect of LITAF on the transcriptional activity of EGR2.

It has been shown that the loss of function of LITAF produces deregulation in the NRG1-erbB signaling in Schwann cells.<sup>9</sup> Of interest, we observed that the steady-state levels of the LITAF T49M mutant protein (in both heterologous systems and in Schwann cells) are consistently much lower than the wild-type form, suggesting a loss of function mechanism. Because adequate NRG1-erbB signaling is pivotal for *EGR2* expression and myelin development, it is conceivable that although a partial decrease in the transcriptional activity of EGR2 P397H or a partial loss of LITAF function does not individually interfere with myelin development, in the compound heterozygotes, the deregulated NRG1-erbB signaling (consequence of a partial loss of LITAF function) will deficiently induce an already transcriptional defective EGR2, interfering with myelin development and peripheral nervous system function.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the participating relatives of the patient for their cooperation throughout this study. They thank Dr. Cruz Morenilla-Palao (Instituto de Neurociencias UMH-CSIC, Spain) for advice in ChIP and other molecular biology experiments. They thank Dr. Philip Woodman and Dr. Lydia Wunderley

(University of Manchester, UK) for providing pGFP-hLITAF and pGFP-hLITAF T49M plasmids, John Svaren (University of Wisconsin) for pPMP22enh-Luciferase, and Dies Meijer (University of Edinburgh, UK) for RT4D6 Schwannoma cells. They also thank Pedro Morenilla-Ayala for technical assistance.

## STUDY FUNDING

This work has been funded by grants BFU2016-75864R (MINECO Spanish Ministry for Economy and Competitiveness), PROMETEO 2018/114 (Conselleria Educació Generalitat Valenciana), and UGP-15-211 (FISABIO) to H. Cabedo.

## DISCLOSURES

This study was funded by the *Spanish Ministry for Economy and Competitiveness (MINECO)*, the *Conselleria de Educació de la Generalitat Valenciana*, and the *Fundació de la Comunitat Valenciana per a la Investigació Saniatria i Biomédica (FISABIO)*. Dr. Blanco-Cantó reports no disclosures. Nikiben Patel reports no disclosures. Sergio Velasco-Aviles reports no disclosures. Angeles Casillas-Bajo reports no disclosures. Dr. Salas-Felipe reports no disclosures. Dr. García-Escrivá reports no disclosures. Dr. Díaz-Marin reports no disclosures. Dr. Cabedo reports no disclosures.

## REFERENCES

1. Rossor AM, Polke JM, Houlden H, Reilly MM. Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Rev Neurol* 2013; 9:562–571.
2. Berciano J, Sevilla T, Casasnovas C, et al. Guidelines for molecular diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease [in Spanish]. *Neurologia* 2012; 27:169–178.
3. Gonzaga-Jauregui C, Harel T, Gambin T, et al. Exome sequence analysis suggests that genetic burden contributes to phenotypic variability and complex neuropathy. *Cell Rep* 2015; 12:1169–1183.
4. Nagarajan R, Svaren J, Le N, Araki T, Watson M, Milbrandt J. EGR2 mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression. *Neuron* 2001; 30:355–368.

5. Srinivasan R, Sun G, Keles S, et al. Genome-wide analysis of EGR2/SOX10 binding in myelinating peripheral nerve. *Nucleic Acids Res* 2012; 40:6449–6460.
6. Warner LE, Svaren J, Milbrandt J, Lupski JR. Functional consequences of mutations in the early growth response 2 gene (EGR2) correlate with severity of human myelinopathies. *Hum Mol Genet* 1999; 8:1245–1251.
7. Saifi GM, Szigeti K, Wiszniewski W, et al. SIMPLE mutations in Charcot-Marie-Tooth disease and the potential role of its protein product in protein degradation. *Hum Mutat* 2005; 25:372–383.
8. Lee SM, Olzmann JA, Chin LS, Li L. Mutations associated with Charcot-Marie-Tooth disease cause SIMPLE protein mislocalization and degradation by the proteasome and aggresome-autophagy pathways. *J Cell Sci* 2011; 124:3319–3331.
9. Lee SM, Chin LS, Li L. Charcot-Marie-Tooth disease-linked protein SIMPLE functions with the ESCRT machinery in endosomal trafficking. *J Cell Biol* 2012; 199:799–816.
10. Beauvais K, Furby A, Latour P. Clinical, electrophysiological and molecular genetic studies in a family with X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy presenting a novel mutation in GJB1 promoter and a rare polymorphism in LITAF/SIMPLE. *Neuromuscul Disord* 2006; 16:14–18.
11. Brockes JP, Fields KL, Raff MC. Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res* 1979; 165:105–118.
12. Jang SW, LeBlanc SE, Roopra A, Wrabetz L, Svaren J. In vivo detection of Egr2 binding to target genes during peripheral nerve myelination. *J Neurochem* 2006; 98:1678–1687.
13. Shy ME, Blake J, Krajewski K, et al. Reliability and validity of the CMT neuropathy score as a measure of disability. *Neurology* 2005; 64:1209–1214.
14. Wilson TE, Day ML, Pexton T, Padgett KA, Johnston M, Milbrandt J. In vivo mutational analysis of the NGFI-A zinc fingers. *J Biol Chem* 1992; 267:3718–3724.
15. Jones EA, Lopez-Anido C, Srinivasan R, et al. Regulation of the PMP22 gene through an intronic enhancer. *J Neurosci* 2011; 31:4242–4250.
16. Myokai F, Takashiba S, Lebo R, Amar S. A novel lipopolysaccharide-induced transcription factor regulating tumor necrosis factor alpha gene expression: molecular cloning, sequencing, characterization, and chromosomal assignment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:4518–4523.

17. Ho AK, Wagstaff JL, Manna PT, et al. The topology, structure and PE interaction of LITAF underpin a Charcot-Marie-Tooth disease type 1C. *BMC Biol* 2016;14:109.
18. Qin W, Wunderley L, Barrett AL, High S, Woodman PG. The Charcot Marie Tooth disease protein LITAF is a zinc-binding monotopic membrane protein. *Biochem J* 2016; 473:3965–3978.
19. Arthur-Farraj P, Wanek K, Hantke J, et al. Mouse schwann cells need both NRG1 and cyclic AMP to myelinate. *Glia* 2011; 59:720–733.





## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Carmen Díaz Marín, directora de esta tesis y ejemplo a seguir. Por confiar en mí y apoyarme en todo momento. Por transmitirme la auténtica pasión por la neurología. Por permitirme llevar a término uno de los proyectos más importantes de mi vida.

Al Dr. Hugo Cabedo Martí, director de esta tesis. Por su apoyo y ayuda imprescindible para la realización de este trabajo. Por reconectarme con la ciencia y darme la oportunidad de disfrutarlo como nunca hubiera imaginado.

A mi familia, siempre. A mi madre, porque su recuerdo es luz y paz. A mi padre, por ser mi guía en el camino de la vida y uno de los centros de mi universo. A mi hermano, por su apoyo auténtico. A mi abuelo, por su sabiduría inmortal. A mis abuelas, por enseñarme el valor de la disciplina, el conocimiento y las cosas bien hechas. Y a todos los demás, por su admiración.

A Cheo, por su apoyo, comprensión y paciencia. Por empujarme y escucharme en los momentos buenos y malos. Por ser el otro centro de mi universo.

A Leia, por su compañía y cariño incondicional.

A mis amigas y amigos de siempre, por su apoyo, confianza ciega y comprensión sin límites. A María Victoria Vaello Rodríguez, por su ayuda imprescindible en la corrección de este trabajo.

A mis amigos de la facultad, sin los cuales no hubiera llegado tan lejos. Por transmitirme el amor a la medicina, acompañarme en el trabajo duro y ejemplificar de la forma más bonita lo que es el compañerismo y la amistad. Por compartir todos juntos la alegría de vivir.

A mis amigos y compañeros de la residencia, con los cuales di los primeros pasos en el fascinante mundo de la neurología y aprendí la pasión por esta profesión.

A mis amigos y compañeros de trabajo que me han acompañado durante estos años, con los cuales he compartido momentos memorables y he aprendido de la medicina y la vida en general. En especial al Dr. Alexandre García Escrivá, por su confianza en mí y por dar lugar a una importante parte de este trabajo.

A los compañeros del laboratorio del Instituto de Neurociencias y a enfermería del Hospital General de Alicante, cuyo trabajo ha sido fundamental para la realización de este proyecto, por su excelente profesionalidad.

A los pacientes y familiares participantes en este estudio, por permitirme aprender de ellos y por su predisposición y colaboración en todo momento. Ellos son los auténticos protagonistas de nuestro trabajo diario.