

Diagnóstico molecular de enfermedades neuromusculares en el Instituto Nacional de Rehabilitación, situación actual y perspectivas

Molecular diagnosis of neuromuscular diseases at the Instituto Nacional de Rehabilitación (National Institute of Rehabilitation), current situation and prospects

Alexandra B Luna-Angulo,^{* &} Rocío Suárez-Sánchez,^{* &} Hernán Cortés-Callejas,[‡] Luis Ruano-Calderón,[§] Rosa E Escobar-Cedillo,^{||} Yessica Tapia-Guerrero,[‡] Luz Márquez-Quiróz,[‡] Joan Jano-Ito,[‡] Ana Lilia Cedeño-Garciadueñas,[¶] Norberto Leyva-García,[‡] Oscar Hernández-Hernández,[‡] Laura Sánchez-Chapul,^{*} Jonathan J Magaña-Aguirre[‡]

* Laboratorio de Enfermedades Neuromusculares, Instituto Nacional de Rehabilitación. México, D.F., México.

‡ Laboratorio de Medicina Genómica, Departamento de Genética, Instituto Nacional de Rehabilitación. México, D.F., México.

§ Subdirección de Enseñanza y Capacitación, Investigación y Calidad en Salud, Secretaría de Salud de Durango, Durango, México.

|| Clínica de Distrofias Musculares, Instituto Nacional de Rehabilitación, México, D.F., México.

¶ Anatomía Patológica, Instituto Nacional de Rehabilitación, México, D.F., México.

& Estas autoras presentaron la misma contribución.

Dirección para correspondencia:
Dr. Jonathan Javier Magaña Aguirre
Laboratorio de Medicina Genómica, CENIAQ,
Departamento de Genética,
Instituto Nacional de Rehabilitación-Luis Guillermo Ibarra Ibarra (INR-LGII).
Av. México-Xochimilco Núm. 289,
Col. Arenal de Guadalupe,
14389, Del. Tlalpan, México, D.F.
Tel: +52 (55) 59991000, ext. 14708

Resumen

En México cerca de seis millones de personas presentan algún tipo de discapacidad, siendo las enfermedades neuromusculares (ENM) una de las causas más frecuentes de invalidez y muerte. Las ENM son condiciones complejas que no sólo afectan al músculo, sino también a la unión neuromuscular, al nervio periférico o a la motoneurona espinal. La gran variabilidad clínica y genética de las ENM dificulta su diagnóstico; en muchos casos se identifican tardíamente o en algunos casos el diagnóstico no llega a realizarse, ya sea por falta de recursos económicos o por desconocimiento de los centros especializados dedicados al estudio de las ENM. En este artículo presentamos una descripción general de las ENM más frecuentes en nuestra población, así como los resultados obtenidos tras la implementación del diagnóstico molecular en el Instituto Nacional de Rehabilitación, en el periodo de los tres últimos años. El trabajo conjunto por los laboratorios de investigación ha impactado en el área asistencial, logrando la confirmación diagnóstica de 636 pacientes, beneficiándolos con un tratamiento más adecuado para cada tipo de patología, acompañado de asesoramiento genético, ayuda psicológica y programas de inclusión social. Los resultados muestran el estado actual y los avances que se tienen a partir del desarrollo de las pruebas diagnósticas que se ofrecen en el instituto. Finalmente, se discuten las perspectivas y el área de oportunidad en el diagnóstico molecular, así como el desarrollo de múltiples pruebas diagnósticas que ya se encuentran en implementación.

Abstract

In Mexico, around six million people have some kind of disability, of which neuromuscular diseases remain one of the most common causes of inability and death. Neuromuscular disorders are rare conditions that affect the muscles, the neuromuscular junction, the peripheral motor nerves and the motor neurons. Their clinical and genetic variability impact in an effective diagnosis; therefore, many cases are identified belatedly or not diagnosed at all, due to lack economic resources or the absence of specialized study centers for neuromuscular diseases. In this article, we offer a general description of the most frequent neuromuscular

E-mail: maganasm@hotmail.com;
jmagana@inr.gob.mx

Dra. Laura Sánchez Chapul
Laboratorio de Enfermedades
Neuromusculares, INR-LGII.
Tel: +52 (55) 59991000, ext.
19300, Fax: 50613931
E-mail: lchapul@yahoo.com

Recibido: 23 de junio de 2015.
Aceptado: 7 de agosto de 2015.

Este artículo puede ser consultado en
versión completa en:
<http://www.medigraphic.com/rid>

Palabras clave: Enfermedades
neuromusculares, distrofias
musculares, distrofia miotónica,
disferlinopatías, ataxia
espinocerebelosa, atrofia
muscular espinal.

Key words: Neuromuscular
disorders, muscular dystrophies,
myotonic dystrophy,
dysferlinopathies,
spinocerebellar ataxia,
spinal muscular atrophy.

diseases in our population, as well as the results obtained following the implementation of molecular diagnosis three years ago in the National Rehabilitation Institute (INR). We confirmed the molecular diagnosis in 636 patients, who received the benefit of a more appropriate treatment, specific to each disease, and genetic counseling, psychological monitoring and an effective social inclusion program. In the final part of this manuscript, we discuss the advances and perspectives of the development of molecular diagnosis of other neuromuscular diseases in INR.

Introducción

Actualmente la discapacidad es considerada un problema de salud pública a nivel mundial. Por definición, los individuos con discapacidad presentan alguna deficiencia de tipo físico, mental, intelectual o sensorial, lo cual condiciona su interacción con el entorno social y puede impedir su participación plena en igualdad de condiciones respecto al resto de la población. En nuestro país, conforme a las más recientes estimaciones del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), cerca de seis millones de individuos presentan algún tipo de discapacidad, siendo la motora la más frecuente.¹ Sin embargo, actualmente existen múltiples padecimientos y patologías que no se han considerado debido a la falta de un diagnóstico efectivo, por lo que las estimaciones finales pueden presentar sesgos. Excluyendo a los accidentes como un origen de discapacidad, se sabe que en algunos casos se pueden presentar padecimientos adquiridos de origen inmunológico, infeccioso (vírico, bacteriano o parasitario), tóxico-medicamentoso o de origen endocrino-metabólico; no obstante, la mayoría de los individuos con discapacidad presentan patologías que se producen y evolucionan desde el nacimiento, las cuales muestran un componente esencialmente

genético.^{2,3} Dentro de estas enfermedades, existe un extenso grupo de padecimientos denominados «enfermedades neuromusculares» (ENM) que pueden afectar a un gran número de personas de manera congénita, en etapas tempranas y tardías de la vida (edad adulta y/o vejez).³ Las ENM son condiciones complejas que afectan al músculo, a la unión neuromuscular, al nervio periférico y/o a la motoneurona espinal. Dichos padecimientos se caracterizan por la pérdida progresiva de fuerza muscular y la degeneración de los músculos y nervios que los controlan, produciendo debilidad, atrofia o pseudohipertrofia muscular, miotonía, calambres o contracturas musculares, mialgias, o en ocasiones, trastornos sensitivos.³ Algunas ENM son multisistémicas y pueden afectar otros órganos como el cerebro, corazón o sistema respiratorio.

Para inicios del presente año se estimó la presencia de 761 patologías con un fenotipo específico, de las cuales 406 se han asociado con genes específicos, mientras que otras 76 regiones génicas se encuentran aún en etapa de caracterización.³ En general, las ENM pueden ser agrupadas por sus características clínicas y genéticas en 16 tipos (*Cuadro I*). Desafortunadamente, el diagnóstico de estas enfermedades se establece tardíamente o en algunos casos no se llega a realizar,

ya sea por falta de recursos económicos y/o por el desconocimiento de la existencia de centros especializados en el estudio y diagnóstico molecular de las mismas, lo que impacta directamente en la atención y el tratamiento de los pacientes, modificando extensamente su calidad y expectativa de vida. Así mismo, un mal manejo del individuo, además de afectar sus condiciones físicas, psicosociales y laborales –y las de sus familiares– impacta directamente al presupuesto del sector salud de nuestro país.

Las ENM más frecuentes en México

Hasta la fecha no existen reportes epidemiológicos que muestren la situación de las ENM en nuestro país; no obstante, el Instituto Nacional de Rehabilitación, al ser un centro de referencia de ENM a nivel nacional, podría reflejar relativamente la situación que se presenta en México. Conforme a la experiencia clínica en nuestro instituto, los tipos de ENM más comunes en nuestro entorno son:

Cuadro I. Clasificación actual de las enfermedades neuromusculares.

Grupo	Enfermedades caracterizadas	Algunos ejemplos:
I. Distrofias musculares	43	Distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular tipo Becker, distrofia facioescapulohumeral, Emery-Dreifuss y distrofia de cinturas, entre otras.
II. Distrofias musculares congénitas	41	Miopatía de Bethlem, síndrome de Ullrich, síndrome Walker-Warburg, entre otras.
III. Miopatías congénitas	41	Miopatía nemalínica 1, miopatía centronuclear dominante, miopatía centronuclear recesiva.
IV. Miopatías distales	17	Miopatía distal de Miyoshi, distrofia muscular tibial, miopatía distal Nonaka, entre otras.
V. Otras miopatías	24	Miopatía miofibrilar, distrofia muscular oculofaríngea, entre otras.
VI. Síndromes miotónicos	9	Distrofia miotónica tipo 1, distrofia miotónica tipo 2, síndrome Schwartz-Jampel, entre otras.
VII. Canalopatías	15	Miotonía congénita de Thomsen, parálisis periódica hipercalemiática, paramiotonía congénita, entre otras.
VIII. Hipertermias malignas	6	Hipertermia maligna 1, hipertermia maligna 2, entre otras.
IX. Miopatías metabólicas	26	Enfermedad de Pompe, enfermedad de McArdle, deficiencia de lactato deshidrogenasa A, entre otras.
X. Cardiomiopatías hereditarias	77	Cardiopatía hipertrófica familiar tipo 1, cardiopatía dilatada tipo 1, entre otras.
XI. Síndromes miasténicos congénitos	26	Síndrome del canal lento, síndrome del canal rápido, deficiencia del receptor de acetilcolina, entre otras.
XII. Enfermedades de la neurona motora	67	Atrofia espinal muscular, esclerosis lateral amiotrófica tipo 1, enfermedad de Kennedy, entre otras.
XIII. Ataxias hereditarias	62	Ataxia espinocerebelosa tipo 2, ataxia espinocerebelosa tipo 7, ataxia de Friedreich, ataxia telangiectasia, entre otras.
XIV. Neuropatías sensoriales y motoras hereditarias	78	Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth 1A, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth 1B, síndrome de Dejerine-Sottas, entre otras.
XV. Paraplejias hereditarias	64	Paraplejía espástica 3, paraplejía espástica 4, entre otras.
XVI. Otras enfermedades neuromusculares	30	Neuropatía amiloide familiar, síndrome de Riley-Day, artrogriposis distal tipo 1, entre otras.

a) Distrofias musculares (DM): Son un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por pérdida y debilidad de la masa muscular; se encuentran categorizadas en el primer grupo de la clasificación de ENM (*Cuadro I*). Inicialmente, se han clasificado por la edad de inicio y el grupo de músculos afectados. Aunque los músculos y el grado de afección es variable, en general los pacientes pierden la capacidad motora y/o de movimiento de manera progresiva, lo que lleva a una dependencia parcial o completa para poder realizar actividades cotidianas. La etiología de las DM se ha relacionado con mutaciones en genes que codifican para proteínas del sarcolema, subsarcolema, citoplasmáticas, sarcoméricas, de matriz extracelular asociadas a glicosilación y retículo sarcoplásmico, lo que afecta directamente a la función de la fibra muscular.⁴⁻⁸ En la actualidad, se han identificado cerca de 50 enfermedades de este tipo.^{4,5} A pesar de su importancia, en México se tienen pocos reportes sobre estos padecimientos; en el año 2012, Gómez-Díaz y colaboradores⁹ reportaron una cohorte de 290 individuos con diagnóstico clínico de distrofia muscular, cuyas biopsias musculares fueron analizadas por inmunofluorescencia. Este reporte indica que se obtuvo un diagnóstico confirmatorio en el 73.11% de los sujetos, siendo las distrofinopatías la causa más frecuente de DM en nuestra población (52.36%), seguidas por las distrofas musculares de cinturas —donde la más frecuente fue la ausencia o disminución de la disferlina (18.40%)—, mientras que el 26.89% conformado por el resto de la población analizada en este estudio no mostró deficiencias en ninguna de las proteínas exploradas.⁸ Sin embargo, con frecuencia los hallazgos por inmunodetección por sí solos no son suficientes para establecer el diagnóstico de distrofia muscular.¹⁰

De acuerdo con el número de pacientes clínicamente caracterizados, se presentan con mayor frecuencia las distrofas musculares de Duchenne (DMD) o de tipo Becker (BMD), así como un conjunto de enfermedades conocidas como «distrofas de cinturas» (LGMD, del inglés *limb-girdle muscular dystrophies*). La DMD es una enfermedad hereditaria ligada al cromosoma X que afecta a 1/3,500 varones nacidos vivos, lo que la hace la distrofia muscular más frecuente en niños. Se caracteriza por la atrofia progresiva de los músculos proximales y pseudohipertrofia de los músculos gastrocnemios.¹¹ El diagnóstico clínico de los niños afectados con DMD generalmente ocurre entre los tres y cinco años de edad. Con la progresión de la enfermedad,

se pierde gradualmente la habilidad para caminar, lo que confina a los pacientes al uso de silla de ruedas entre los 13 y 15 años. Adicionalmente, la debilidad muscular provoca complicaciones respiratorias y cardiomiopatía, lo que conduce finalmente a la muerte. La BMD es una presentación clínica de menor severidad comparada con la DMD; de hecho, en este grupo de individuos la marcha independiente se mantiene por tiempos más prolongados.¹² Ambas patologías son causadas por mutaciones en el gen *DMD*, que codifica para la proteína distrofina, la cual contribuye a la estabilidad del sarcolema durante la contracción de la fibra muscular.¹³ Se conoce que cerca del 60-70% de las mutaciones observadas en los sujetos son deleciones, entre 5 y 10% son duplicaciones, y entre el 25 y 30% son mutaciones puntuales.^{14,15} Cuando las mutaciones en el gen *DMD* interrumpen el marco de lectura, se produce una proteína truncada que no es funcional, lo que desencadena el fenotipo DMD; por el contrario, si las mutaciones no interrumpen el marco de lectura, la proteína producida será parcialmente funcional, lo que llevará al desarrollo de un fenotipo BMD.¹⁶ Por su parte, las LGMD se definen como un grupo heterogéneo de enfermedades de expresión clínica y evolución variable donde se han reconocido más de 29 genes causales.³ Las LGMD se presentan en las tres primeras décadas de la vida y afectan músculos de la cintura escapular y pélvica, sin alterar los músculos faciales; la presencia de pseudohipertrofia es poco frecuente y la progresión va de moderada a grave. El tipo de herencia es autosómico dominante (LGMD1) y autosómico recesivo (LGMD2), siendo estas últimas las más frecuentes.¹⁷ En las formas recesivas, los primeros signos aparecen frecuentemente antes de los 20 años, y en las formas dominantes, el inicio puede ser más tardío. Los pacientes afectados presentan dificultad para correr, subir escaleras y levantarse del suelo. Las caídas son frecuentes y las pantorrillas pueden presentar hipertrofia, en especial en las sarcoglicinopatías. Actualmente, los avances de la genética molecular han brindado una mejor comprensión de los procesos relacionados con la presentación clínica; sin embargo, la heterogeneidad genética y clínica de las LGMD dificulta su diagnóstico. Para ello, con el objetivo de contar con un diagnóstico diferencial certero, se han desarrollado técnicas inmunohistoquímicas de inmunodetección en fase sólida (WB), citometría de flujo, MLPA (del inglés *multiplex ligation-dependent probe amplification*), así como secuenciación.¹⁸⁻²⁴

b) Síndromes miotónicos: Dentro de este conjunto de enfermedades que conforman al sexto grupo de la clasificación de ENM (*Cuadro I*), sobresale la distrofia miotónica tipo 1 (DM1) o enfermedad de Steinert. La DM1 es un desorden multisistémico con herencia autosómico dominante cuya presentación clínica consiste en miotonía, distrofia muscular, defectos de conducción cardíaca, cataratas iridiscentes posteriores, afecciones del sistema nervioso central y desórdenes endocrinológicos.²⁵⁻²⁷ Es considerada como la distrofia muscular progresiva más común en los adultos, con una prevalencia mundial de 1/8,000. La mutación causante de la DM1 se localiza en la región 3' no traducida (3'UTR) del gen *DMPK* y consiste en un incremento del número de repetidos del triplete CTG;²⁶⁻²⁸ los individuos sanos presentan de cinco a 35 repeticiones de este trinucleótido, mientras que los enfermos poseen más de 50 y hasta 4,000 unidades repetidas del triplete CTG.²⁹ Existe una condición conocida como «premutación» (con la presencia de entre 36 y 49 repetidos CTG) que, a pesar de no causar sintomatología aparente, puede generar una mutación con penetrancia completa de una generación a otra. A diferencia de otras ENM, la DM1 se caracteriza por presentar el fenómeno de anticipación, por lo cual la enfermedad tiene un inicio más temprano y un curso más severo en las subsecuentes generaciones.²⁷ La expansión anormal de los repetidos provoca predominantemente un efecto tóxico del RNAm mutante, el cual se acumula en el núcleo de las células afectadas y provoca su unión aberrante con proteínas que participan en la regulación de procesos nucleares, como moduladores del procesamiento alternativo de transcritos (*splicing* alternativo) y factores de transcripción, lo que modifica finalmente la expresión de diversos genes, impidiendo que las proteínas para las cuales codifican lleven a cabo sus funciones; esto provoca que la patología presente síntomas multisistémicos.³⁰ La determinación del número de repetidos CTG en el gen *DMPK* es fundamental para establecer el diagnóstico de DM1 y distinguir esta condición entre otras enfermedades como las canalopatías.²⁹

c) Enfermedades de la motoneurona: Dentro de este grupo (grupo 12 de las ENM), la enfermedad de mayor importancia es la atrofia muscular espinal (SMA por sus siglas en inglés), la cual corresponde con un grupo de ENM de origen genético autosómico recesivo, con una incidencia estimada de 1/6,000 a 1/10,000 nacidos vivos; es considerada

la principal causa de mortalidad infantil de origen genético. La SMA se caracteriza por la degeneración de las neuronas motoras alfa en la médula espinal y tronco cerebral, lo que resulta en una debilidad muscular proximal progresiva, hipostenia y parálisis, que son por lo general simétricas.³¹ La SMA se clasifica de acuerdo con su presentación, en función de la gravedad clínica, en los tipos I, II, III o IV. Los pacientes tipo I nunca son capaces de sentarse en posición vertical y por lo general muestran una rápida pérdida de tono muscular antes de los seis meses de edad. La mortalidad en pacientes SMA tipo I se presenta cerca del primer año de vida por insuficiencia respiratoria u otras comorbilidades asociadas. Los individuos con SMA tipo II pueden sentarse en posición vertical, pero deambulan con ayuda. En el tipo III, los sujetos pueden caminar, pero pierden esta función con el tiempo, y los enfermos tipo IV sólo muestran evidencia del deterioro neuromuscular en etapas tardías.³² Este desorden es causado por mutaciones en el cromosoma 5q11.2-q13.3 que afectan el gen de supervivencia de la neurona motora (*SMN1*). Aproximadamente el 95% de los casos de SMA presenta una delección homocigota en el exón 7 del gen *SMN1*. El ser humano presenta dos genes *SMN* (*SMN1* y *SMN2*), los cuales son homólogos; sin embargo, el gen *SMN2* presenta pequeñas variaciones tipo SNP (del inglés *single-nucleotide polymorphism*) en el exón 7 y algunas regiones intrónicas. Si bien la secuencia de aminoácidos codificada no se modifica, este SNP interrumpe la interacción de un complejo modulador de empalme de RNA, lo que resulta en la exclusión del exón 7 en el 90% de los transcritos de RNAm de *SMN2*; la proteína resultante no es funcional y se degrada rápidamente. El 10% restante de los transcritos de *SMN2* tiene un procesamiento adecuado y esta fracción da lugar a proteína funcional.^{33,34} El principal modulador del fenotipo de pacientes con SMA es el gen *SMN2*. Se ha observado una correlación entre el número de copias de *SMN2* y la severidad de la enfermedad; por ejemplo, los individuos con SMA tipo I portan una sola copia de *SMN2*, mientras que los sujetos con tipo IV tienen más de tres copias de este gen.³⁵ Por esta causa, la determinación del número de copias del gen *SMN2*, así como la identificación de las mutaciones en el gen *SMN1* son claves para un diagnóstico efectivo.

d) Ataxias hereditarias: Este grupo de enfermedades conforma al grupo número 13 de la clasificación de

ENM (*Cuadro I*). La ataxia es un síntoma que se puede definir como la descoordinación al realizar movimientos que no es resultado exclusivo de debilidad muscular; además, se caracteriza por un trastorno de la marcha que se manifiesta por inestabilidad y aumento en la base de sustentación.³⁶ La ataxia es causada por una disfunción del cerebelo, sus vías asociadas, médula espinal, nervios periféricos o una combinación de éstos. Con base en su patrón de herencia, las ataxias hereditarias son subclasificadas como autosómico dominante, autosómico recesivo, ligadas al cromosoma X y mitocondriales.³⁷ Las ataxias cerebelosas autosómicas dominantes (ADCA, del inglés *autosomal dominant cerebellar ataxias*) son patologías que presentan una alta heterogeneidad clínica, genética y neuropatológica. Dentro de este grupo se encuentran las ataxias espinocerebelosas (SCA), las ataxias episódicas y la ataxia espástica autosómica dominante.³⁸ Las SCA constituyen el grupo de mayor importancia clínica debido a su mayor frecuencia y a su evolución en los pacientes; se caracterizan por una degeneración progresiva del cerebelo, tallo cerebral y otras partes del sistema nervioso central, y tienen una incidencia de 5-7 por cada 100,000 habitantes.³⁹ La variabilidad clínica provoca que el diagnóstico en estas patologías sea complicado debido a que existe una imbricación entre el fenotipo y el genotipo, lo que hace necesario clasificar a los diferentes tipos de SCA mediante su vinculación a la mutación en el *locus* cromosomal que la origina. Con los avances de la biología molecular, en los últimos 20 años se han descrito alrededor de 36 variedades de SCA. A nivel mundial, la SCA de mayor frecuencia es la SCA3 (enfermedad de Machado-Joseph), la cual representa el 21% de todas las ataxias autosómicas dominantes; en segundo lugar, la SCA2 y SCA6, con el 15% cada una, seguidas por SCA 1, con 6%; en quinto lugar está la SCA7, con 5%.⁴⁰ Sin embargo, cada región geográfica posee variaciones en su frecuencia; por ejemplo, en México, al igual que en Cuba y la India, la SCA2 representa la causa más frecuente de ADCA.⁴¹ También existen SCA casi exclusivas de ciertas regiones o poblaciones, como la SCA10, que se considera exclusiva de mexicanos y brasileños,^{42,43} así como la presencia de un efecto fundador de SCA7 en nuestro país.⁴⁴⁻⁴⁶

La mutación genética que origina la gran mayoría de las SCA consiste en la expansión anormal del trinucleótido repetido CAG. Estos repetidos se localizan en regiones génicas tanto codificantes

como no codificantes.³⁸⁻⁴⁰ Existe un número de repeticiones para cada una de las diferentes SCA que representa el umbral entre el estado normal y patológico, de tal manera que un incremento que rebasa esta frontera origina la aparición de la sintomatología. Por lo tanto, para diferenciar a cada condición y tener un tratamiento especializado, es necesario determinar el tipo de ataxia a través del diagnóstico molecular.

e) Neuropatías motosensoriales hereditarias: Por último, en el grupo 14 de la clasificación de ENM se encuentran las neuropatías periféricas sensoriales y motoras hereditarias, las cuales afectan entre 17 y 40/100,000 habitantes a nivel mundial. Las neuropatías hereditarias son un grupo de trastornos neurológicos genética y clínicamente heterogéneos que afectan de manera preponderante al sistema nervioso periférico. Dentro de estos desórdenes, la forma etiológica más importante es la neuropatía hereditaria motora-sensitiva, también conocida como «enfermedad de Charcot-Marie-Tooth» (CMT).⁴⁷ La CMT produce manifestaciones clínicas caracterizadas por debilidad distal en extremidades, deformación del pie (pie cavo), debilidad y atrofia muscular progresiva.⁴⁸ Con base en las características clínicas y las velocidades de neuroconducción motora (VNM), la CMT se clasificó inicialmente en dos tipos: a) CMT1, que afecta directamente la mielina de las células de Schwann y se caracteriza por la disminución de las VNM por debajo de 38 m/s; y b) CMT2, que afecta principalmente los axones de las neuronas periféricas, sin que las VNM se vean alteradas significativamente (VNM > 38 m/s).⁴⁹ Recientemente se han identificado otros tipos de CMT que producen afecciones tanto a nivel de mielina como a nivel axonal,⁵⁰ por lo que la identificación de los genes relacionados con este tipo de enfermedades ha permitido una mejor clasificación.^{46,47} En muchas de las poblaciones estudiadas, la CMT1A es considerada como el subtipo más frecuente, por lo que su estudio adquiere gran importancia.⁵¹ La CMT1A es producida en la gran mayoría de los casos por la duplicación de una región de 1.5 Mb en el *locus* 17p11.2-p12, donde se localiza el gen *PMP22* que codifica para el componente de la mielina del sistema nervioso periférico, la proteína integral de membrana PMP22.⁵² Se ha sugerido que el aumento en la dosis génica de *PMP22* ocasiona las manifestaciones clínicas en el subtipo CMT1A. Adicionalmente, se han reportado mutaciones puntuales menos frecuentes en el gen *PMP22* asociadas con CMT.⁵³ Debido a la alta frecuencia

de CMT1A a nivel mundial, los estándares internacionales para el diagnóstico de las neuropatías periféricas hereditarias resaltan que la detección de la duplicación génica de *PMP22* es fundamental en el diagnóstico de pacientes con características clínicas de CMT.^{54,55}

Panorama en México

Las ENM actualmente no tienen cura; sin embargo, la caracterización a nivel de gen, RNAm o proteína, ha permitido entender mejor las bases moleculares para comenzar a proponer posibles terapias que nos permitan aminorar las manifestaciones clínicas. A pesar de ello, en México existe una gran limitante respecto a la práctica clínica de las ENM, principalmente desde la identificación del tipo de patología. Ante este escenario, en los últimos años se ha conformado un grupo multidisciplinario de investigadores y médicos especialistas que nos hemos dado a la tarea de estudiar estas enfermedades. Las líneas y proyectos de investigación que se tienen en común han generado nuevos conocimientos, han sido la base que ha sustentado la parte asistencial y han permitido satisfacer algunas necesidades diagnósticas en beneficio de los pacientes. La unión de diversos laboratorios y servicios médicos del INR ha permitido generar diagnósticos confirmatorios más rápidos, certeros y confiables para nuestros enfermos. En el presente artículo presentamos los resultados obtenidos en los últimos tres años mediante la implementación de técnicas diagnósticas de las ENM, lo que nos da una perspectiva de las patologías más frecuentes en nuestra población.

Material y métodos

Selección de pacientes

Se analizaron 902 individuos mestizos mexicanos de ambos sexos con características clínicas de ENM, provenientes de distintos puntos de la República Mexicana, con al menos tres generaciones nacidas en el país y reclutados por la clínica de distrofias musculares del INR. Los criterios clínicos para la selección de los sujetos se basaron en las guías clínicas y los manuales de procedimientos establecidos en el sistema de gestión de calidad ISO9001:2008 para la clínica de distrofias musculares. Todos los enfermos presentaron una historia clínica completa, acompañada de los estudios clínicos y paraclínicos necesarios para cada tipo de paciente. Los pacientes se integraron al

protocolo voluntariamente mediante la firma de una carta de consentimiento informado. Los protocolos específicos para cada patología se encuentran reconocidos y aprobados por el Comité de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Diagnóstico de ENM

Todos los métodos diagnósticos fueron estandarizados y validados para su uso en el INR. Para los diagnósticos moleculares que así lo requirieron, el ADN genómico se extrajo a partir de leucocitos de sangre periférica utilizando el sistema de purificación Genra PureGene (Qiagen, Hilden, Germany).

Estudios moleculares para DMD/BMD: En el INR, el diagnóstico molecular de DMD/BMD se ha comenzado a realizar muy recientemente. A la fecha se realiza un escaneo inicial por PCR multiplex, el cual posteriormente se complementa con el diagnóstico por MLPA (MRC Holland). La técnica de PCR multiplex fue descrita previamente por Chamberlain⁵⁶ y por Beggs,⁵⁷ y permite analizar deleciones de los exones 1, 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 50, 51, 52 y 60 del gen *DMD*. El ADN de los pacientes fue analizado en dos reacciones de PCR multiplex usando los oligonucleótidos descritos previamente por Chamberlain (exones 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 46, 48 y 51) y Beggs (exones 1, 3, 6, 13, 43, 47, 50, 52 y 60). Para la reacción de PCR se utilizó el kit Multiplex PCR de Qiagen, de acuerdo con las condiciones sugeridas por el proveedor. Los amplicones obtenidos fueron analizados en geles de poliacrilamida al 6%, usando como referencia los amplicones obtenidos a partir de la PCR multiplex de la muestra de un individuo sano.

Estudios diagnósticos para LGMD: El diagnóstico de LGMD consiste en el análisis de proteínas en biopsias musculares a través de técnicas como inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Western blot (WB), y para el caso de disferlina, por citometría de flujo en monocitos de sangre periférica.

a) Inmunofluorescencia indirecta: Para esta técnica se tomaron biopsias musculares del cuádriceps o deltoideas. Las muestras se congelaron en isopentano enfriado con nitrógeno líquido para realizar cortes de 7-10 μm de espesor.⁹ Los cortes se sometieron a tinciones histológicas de rutina como hematoxilina-eosina (HE) y tricrómico modificado por Engel y Cunningham para evaluar la integridad del tejido e identificar cambios distróficos.² El inmunomarcaje de las criosecciones se realizó utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra 14 proteínas de músculo y, posteriormente, se utilizó un segundo

anticuerpo marcado con un fluorocromo para evidenciar la unión anticuerpo-proteína con la ayuda de un microscopio de fluorescencia Olympus BX60. El análisis semicuantitativo de la expresión de proteínas por IFI se reportó como expresión normal +++, disminución ++, disminución severa + y ausencia –.⁹

b) Western blot: Para el análisis por WB, se obtuvieron extractos proteicos a partir de 10 a 15 criosecciones de músculo homogeneizadas en solución de lisis. Posteriormente, se sometieron 50 µg de proteína total a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa sobre la cual se realizó la inmunodetección de la(s) proteína(s) de interés con anticuerpos primarios específicos a distrofina, disferlina y calpaina-3. Tras ello, el anticuerpo primario fue identificado por un anticuerpo secundario (acoplado a peroxidasa) y evidenciado por quimioluminiscencia. Las condiciones de electroforesis, transferencia e inmunomarcaje se realizaron según lo reportado por Anderson y colaboradores.⁵⁸ Los niveles de proteína en cada caso se normalizaron con la detección de proteínas constitutivas (β-actina, MHC o GAPDH) y la cuantificación relativa se realizó con el programa Chemilmager 4400.

c) Citometría de flujo: Se realizó la cuantificación de

disferlina en monocitos CD14+ de sangre periférica en pacientes con diagnóstico clínico de disferlinopatías; se emplearon muestras de sujetos sanos sin patologías asociadas a músculo como control. Se utilizaron 100 µL de sangre fresca recolectada en tubos con EDTA. Los monocitos fueron doblemente marcados por IFI empleando dos anticuerpos primarios: anti-CD14-PerCP-Cy5.5 humano para seleccionar la población de monocitos y el anticuerpo anti-disferlina C-terminal (Clona HAM1/7B6, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Las condiciones de tinción se realizaron conforme a un protocolo establecido recientemente en el INR. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) y el cálculo de la cantidad relativa de disferlina, expresada como el índice medio de fluorescencia (IMF) se realizó con el software FlowJo5.7.2 (Tree Star, Ashland, USA). Los experimentos se realizaron con el control de isotipo correspondiente y por triplicado.

Estudios moleculares para DM1: El análisis de los repetidos CTG del gen *DMPK* se llevó a cabo mediante PCR empleando un par de oligonucleótidos que flanquean los repetidos CTG. El oligonucleótido sentido se marcó con el fluoróforo «hexaclorofluoresceína» (HEX). El diseño de los oligonucleótidos y las condiciones de corrida se realizaron conforme a lo reportado por Magaña y colaboradores.²⁹ Para la identificación de alelos expandidos por encima de 100 repeticiones se empleó la técnica TP-PCR (del inglés *triplet-primed PCR*) utilizando tres oligonucleótidos para la PCR: el oligonucleótido sentido marcado fluorescentemente (previamente descrito como P1), un oligonucleótido quimérico P4CTG que va dirigido a cinco repetidos CTG, y un oligonucleótido P3R, el cual se dirige a la región quimérica de los amplicones iniciales con el objetivo de optimizar la amplificación inicial; las condiciones de amplificación se ajustaron conforme a lo reportado por Magaña y su grupo.²⁹ El análisis de fragmentos se realizó a través de un sistema de electroforesis capilar ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y, posteriormente, se estudiaron mediante el programa GeneScan. Todos los individuos que presentaron un solo alelo fueron regentotipificados mediante TP-PCR para descartar posibles falsos negativos. Todos los resultados diagnósticos se analizaron por triplicado. Para la estimación del número de repeticiones por encima de 100 CAG, así como la magnitud del mosaicismosomático en cada paciente, se realizó la técnica SP-PCR (del inglés *small-pool PCR*) resuelto en geles de agarosa al 1.5% que posteriormente se

Cuadro II. Diagnósticos positivos para ENM realizados en los últimos tres años en el INR.

Diagnóstico molecular (INR)	Casos positivos (636)
DM1	236
CMT1A	116
LGMD	
Disferlinopatía	50
Sarcoglicanopatía	45
Caveolinopatía	3
Calpainopatía	3
SCA7	85
SMA	46
SCA2	32
SCA3	18
DMD*	8

* Los resultados para esta patología se cuantificaron a partir de diciembre del 2014.

transfirieron a membranas de nailon por el método de Southern blot. El método de detección se basó en el marcaje con digoxigenina de sondas específicas para los repetidos CTG modificadas en su grupo furanosa (*locked nucleic acid*) de acuerdo con lo estipulado por Tomé y colegas.⁵⁹

Estudio molecular para SMA: La determinación de la delección en el exón 7 del gen *SMN1* se realizó mediante la técnica Tetra primer PCR reportada por Baris y colaboradores.⁶⁰ Mediante este procedimiento es posible identificar la mutación homocigota en el gen *SMN1* responsable de aproximadamente el 95% de los casos de SMA. Se utilizaron *primers* capaces de reconocer la diferencia de bases en el exón 7 (posición 840 A/T) de los genes *SMN1* y *SMN2*. Tras la PCR, se realizó electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio para visualizar tres productos de amplificación que corresponden al exón 7 de los genes *SMN1* y *SMN2*, así como un producto proveniente de ambos genes. Por otra parte, la determinación del número de copias del gen *SMN2* se realizó mediante MLPA utilizando el kit comercial P060 de la marca MRC Holland, siguiendo las instrucciones del fabricante. Además de confirmar el estado homocigoto de la mutación en *SMN1*, esta técnica permite determinar el número de copias del gen *SMN2* mediante el cálculo de la intensidad de fluorescencia de los productos de amplificación una vez que éstos se han separado por electroforesis capilar.

Estudios moleculares para SCA: El diagnóstico molecular se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en una reacción multiplex, empleando un par de oligonucleótidos específicos que flanquean los repetidos CAG para *SCA1*, *SCA2*, *SCA3*, *SCA6* y *SCA7*, conforme a las condiciones reportadas por Magaña y su grupo, 2014.⁴⁵ Cada oligonucleótido sentido fue marcado con diferentes fluoróforos de acuerdo con el tamaño esperado (*SCA1*-VIC; *SCA2*-NED; *SCA3*-FAM; *SCA6*-FAM; y *SCA7*-NED). Para el análisis de los productos de la PCR se mezcló una alícuota de 1.4 µL con formamida desionizada y una alícuota del marcador de peso molecular (ABI GeneScan-500 LIZ). Las muestras se analizaron en el secuenciador automatizado ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a una temperatura constante (60 °C), un voltaje de 15 kV y un tiempo de corrida de 40 min. Para el análisis de los datos y la asignación del número de repetidos por alelo se empleó el programa GeneScan. Para los alelos homocigotos se realizó una TP-PCR de acuerdo con lo reportado

por Cagnoli y colegas, para evitar la presencia de algún falso negativo.⁶¹

Estudios moleculares para CMT1A: El análisis de la duplicación del gen *PMP22* se llevó a cabo mediante qPCR, empleando ensayos TaqMan™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La cinética de amplificación para el gen *PMP22* fue normalizada con respecto a la cinética del gen de albúmina sérica humana (*HSA*), usado como control endógeno, con lo que fue posible determinar la dosis génica de *PMP22* en cada muestra analizada. Se utilizaron oligonucleótidos y sondas marcadas fluorescentemente, dirigidos al exón 3 del gen *PMP22*, así como al exón 12 del gen *HSA*. Las condiciones de amplificación se realizaron conforme a lo reportado por Cortés y colaboradores.⁵⁵ Las muestras se analizaron por triplicado, en presencia de un control positivo y uno sano confirmados previamente (Kleberg Cytogenetics Laboratory, Baylor College Medicine, Houston, TX, USA). Para el análisis de datos se empleó el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ a través del programa Step One 2.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Resultados

Durante los tres últimos años se han implementado técnicas moleculares y bioquímicas para el diagnóstico de 902 pacientes. El diagnóstico fue confirmado en el 70.51%, mientras que en sólo un 26.49% el resultado fue negativo. Cabe mencionar que los enfermos fueron seleccionados de acuerdo con sus características clínicas para diagnóstico de DMD, BMD, LGMD, DM1, SMA, SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 y CMT1A; sin embargo, aún existe un alto número de individuos que no son candidatos para diagnóstico de estas patologías y aún no cuentan con diagnóstico molecular. Conforme a los resultados obtenidos, en el *cuadro II* se muestran las patologías más comunes con diagnóstico confirmado en el INR durante el periodo 2012-2015.

De manera interesante, los sujetos con DM1 presentaron la mayor frecuencia de individuos diagnosticados en nuestra población: a la fecha se han identificado 70 familias con la patología, de las cuales 224 presentaron DM1 tipo clásica, 12 DM1 tipo congénita y 12 casos de premutaciones. De manera paralela, se ha contemplado un programa de asesoramiento genético y apoyo psicológico para los pacientes y familiares, así como una atención integral en los diferentes servicios del INR. En este sentido, se han analizado 190 muestras de familiares que resultaron ser negativas para la mutación.

Cabe mencionar que sólo ocho personas con características clínicas y descargas miotónicas positivas fueron negativas para DM1, lo que podría sugerir la presencia de DM2 en nuestra población, aunque en muy baja frecuencia. En la *Figura 1* se observan los patrones electroforéticos tanto para un individuo positivo (13/ > 100 CTG) como para una premutación (13/46 CTG) y un enfermo negativo (5/11 CTG) a través de las técnicas complementarias de PCR y TP-PCR. Finalmente, los resultados preliminares a través de SP-PCR mostraron un alto grado de mosaicismo somático en sujetos con DM1.

Respecto a las distrofias musculares de cinturas, a lo largo de tres años de trabajo se han identificado 157 pacientes referidos por la Clínica de Enfermedades Neuromusculares del INR, por el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, el Hospital General 450 de Durango y la Asociación de Distrofia Muscular de Oriente (ADMO) con diagnóstico clínico de LGMD, electrofisiológico y de laboratorio. La detección de alteraciones en la expresión de disferlina por IFI en músculo fue realizada en 50 pacientes (31.8%), sarcoglicanos en 45 (28.6%), calpaína-3 en tres (1.91%) y caveolina en tres (1.91%). Para el caso de las LGD-M2A, tres casos fueron confirmados por WB. De los 50 diagnosticados como disferlinopatías por IFI, 29 fueron identificados por citometría de flujo, resaltando el hecho de que los resultados que se observaron en músculo correlacionaron con los resultados encontrados en el análisis citométrico de monocitos (*Figura 2*). Cabe mencionar que se han reportado por primera vez niveles normales de disferlina en monocitos CD14+ en sujetos sanos, lo que en comparación con los niveles expresados en pacientes con disferlinopatía, permitió establecer un algoritmo simplificado basado en las tasas de similitud de los diferentes puntos de corte del IMF de disferlina, que nos va a permitir clasificar en un futuro a individuos con sospecha clínica de esta enfermedad.

En relación con la SMA, se han evaluado 91 pacientes con diagnóstico clínico sugestivo, confirmándose el diagnóstico en 46 de ellos (50.5%) mediante procedimientos moleculares (*Figura 3*). La mayoría de los individuos estudiados corresponde a casos de SMA tipo II y algunos tipo III, mostrando una asociación con el número de copias del gen *SMN2*, consistente con lo reportado en la literatura. De igual manera, es importante señalar que la delección homocigota del gen *SMN1* en todos los sujetos analizados hasta ahora se ha detectado tanto por MLPA como por PCR, siendo los resultados consistentes en el 100% de los casos (*Figura 3*).

Respecto a las SCA, se diagnosticaron 22 pacientes con SCA2, seguidos de 18 enfermos con SCA3; dichas personas se concentraron geográficamente en la región central del país; sin embargo, un alto número de individuos con SCA7 han sido diagnosticados, identificando hasta la fecha 85 sujetos con la patología. De manera interesante, los pacientes con SCA7 pertenecen a una región geográfica del sureste del país, lo que indica que este fenómeno se presenta particularmente en la región central del estado de Veracruz. Es indudable que las frecuencias de ciertas patologías pueden variar de población a población aun en nuestro mismo territorio nacional. Respecto al diagnóstico de SCA, se identificaron 20 casos negativos que podrían relacionarse con otros tipos de SCA en nuestra población.

Por otro lado, las neuropatías periféricas son un grupo de padecimientos muy comunes en nuestro instituto. Se analizaron por triplicado 243 muestras de enfermos referidos por la Clínica de Enfermedades Neuromusculares del INR y otros hospitales e institutos nacionales de salud con diagnóstico clínico y electrofisiológico de CMT. La duplicación del gen *PMP22* fue detectada en 116 sujetos (47.73%). Este porcentaje fue similar a la frecuencia de CMT1A reportada en poblaciones clínicas de España, Estados Unidos, Finlandia y Suecia ($p \geq 0.05$). Sin embargo, existen diferencias estadísticamente significativas con países como Japón ($p = 0.0001$), Rusia ($p = 0.0035$) y Gran Bretaña ($p = 0.0001$), los cuales presentan una menor frecuencia de dicha patología. Conforme a los valores obtenidos por el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ para la detección de la duplicación de *PMP22*, los 116 individuos positivos mostraron valores en promedio de 1.77 ± 0.18 , conforme a lo esperado (valores mayores a 1.5); mientras que las 127 personas negativas presentaron valores promedio de 1.05 ± 0.11 , semejante a lo observado en las 13 muestras utilizadas como controles sanos (1.02 ± 0.12).

Respecto a DMD/BMD, de noviembre de 2014 a la fecha se ha realizado el diagnóstico de 22 pacientes con fenotipo DMD, de quienes, por PCR multiplex, se ha obtenido el diagnóstico positivo para ocho individuos. Debido a que la técnica de PCR multiplex sólo analiza delecciones de 19 exones, y a que la DMD/BMD puede ser causada no sólo por delecciones, sino también por duplicaciones o mutaciones puntuales en cualquiera de los 79 exones del gen *DMD*, no se puede descartar que el resto de los sujetos tenga alguna mutación, por lo que es necesario complementar el diagnóstico con un análisis por MLPA, el cual ha sido implementado en nuestro laboratorio.

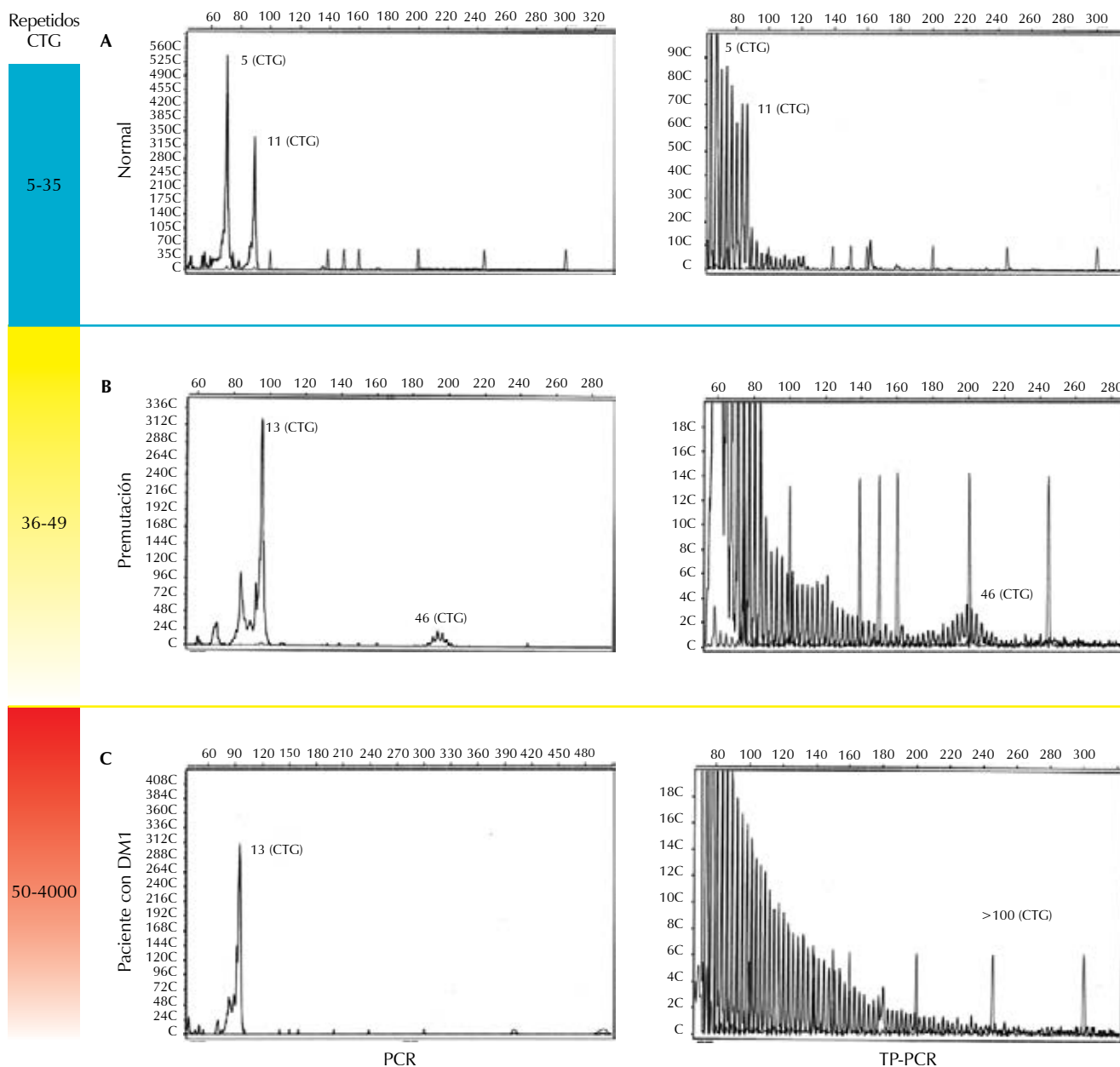


Figura 1. Genotipificación de los repetidos CTG en el gen *DMPK*. Los corrimientos electroforéticos para la determinación de los repetidos CTG se realizaron a través de PCR convencional (panel de la izquierda) y TP-PCR (panel de la derecha) analizados mediante un sistema de electroforesis capilar. A la izquierda de la figura se asocia el fenotipo de un individuo respecto al número de repetidos CTG. **A)** El electroferograma confirma la presencia de dos alelos en un rango de normalidad con 5 y 11 repetidos correspondiente a un individuo sano, mientras que la TP-PCR confirma un número de amplificaciones correspondientes a los alelos determinados por PCR convencional. **B)** Se muestra la presencia de un alelo normal (13 repetidos) y un alelo en rango de inestabilidad con 46 repetidos CTG, que corresponde para un individuo con premutación; para la TP-PCR, se observa un gran número de amplificaciones definiendo perfectamente el alelo premutado. **C)** Finalmente, a través de PCR convencional, se observa sólo un alelo normal con 13 repetidos CTG; sin embargo, el análisis de TP-PCR muestra un patrón electroforético que confirma la presencia de un alelo mayor a 120 repetidos, lo que significa la presencia de un individuo con DM1.

Discusión

Las ENM son causa frecuente de morbilidad adulta y pediátrica. Estos trastornos son causa de discapacidad progresiva en la persona que las padece, por lo que el diagnóstico oportuno es fundamental. Hasta la fecha no existen datos epidemiológicos en nuestra

población; sin embargo, la necesidad de contar con servicios médicos especializados para el tratamiento de estos pacientes se ha incrementado en los últimos años. El conocer el tipo específico de patología que un individuo presenta es fundamental para desarrollar un plan específico de tratamiento y prevención de complicaciones, ya que se puede dar un tratamiento

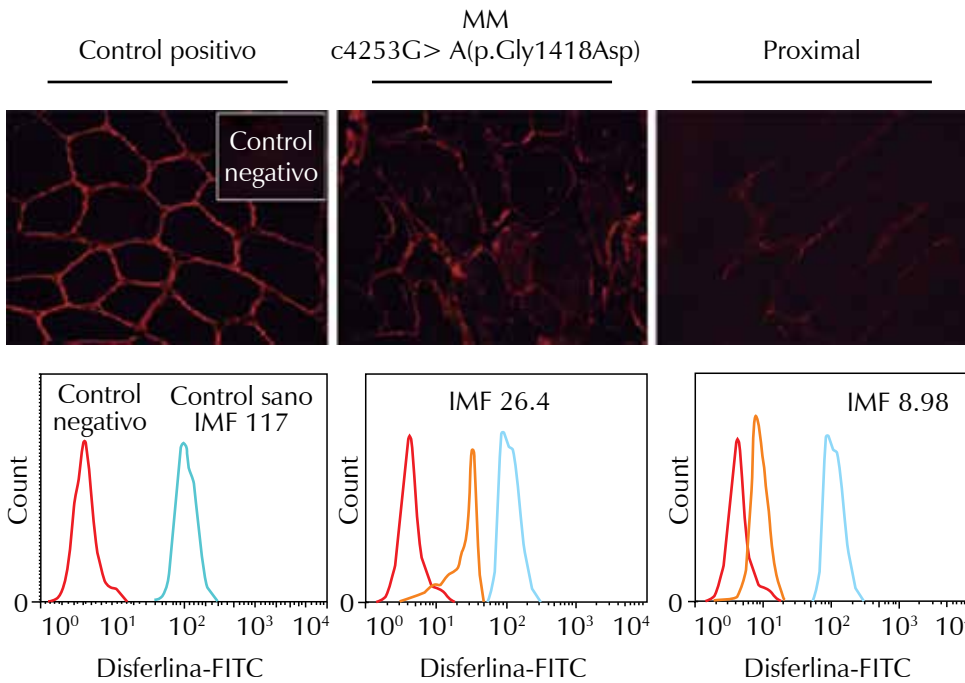


Figura 2.

Expresión de disferlina mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo. La presencia de disferlina se observa localizada en la membrana celular del tejido muscular de un individuo control y se observa claramente disminuida en los pacientes con disferlinopatías (panel superior). La presencia de disferlina correlaciona directamente con la cuantificación a través de citometría de flujo (panel inferior).

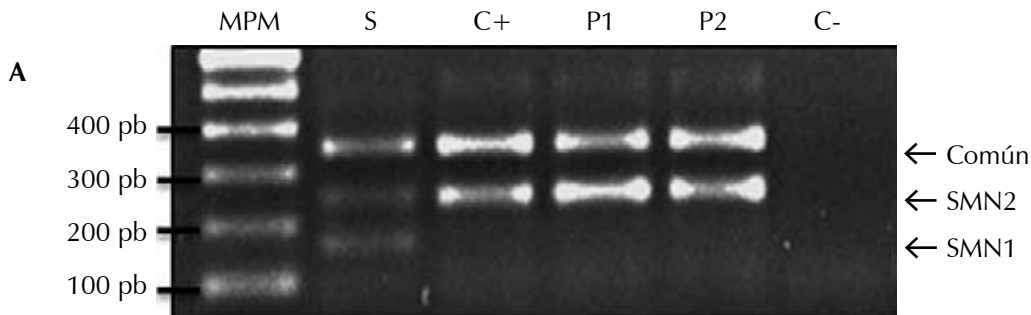


Figura 3A. Diagnóstico molecular de SMA. **A)** Perfil electroforético de los productos de PCR obtenidos mediante la técnica de Tetra Primer PCR para la detección de delección en el exón 7 del gen *SMN1*. A partir de una muestra de DNA de un individuo sano (S), se detectaron los productos de amplificación que corresponden al exón 7 de los genes *SMN1* (*SMN1*) y *SMN2* (*SMN2*), así como una banda de amplificación correspondiente a una secuencia común a ambos genes (Común). Por su parte, a partir de una muestra de DNA positiva para SMA (carril C+), únicamente se detectaron las bandas de amplificación correspondientes al gen *SMN2* y la secuencia común, pero no se detectó el producto de amplificación proveniente del exón 7 del gen *SMN1*. Los productos de PCR de dos muestras problema (P) presentaron un patrón de corrimiento electroforético idéntico a la muestra control de SMA (C+), confirmando la presencia de la mutación. El control negativo de la reacción de PCR (control sin DNA, carril C-) no mostró producto de amplificación específico. MPM: marcador de peso molecular en pares de bases (pb).

adecuado considerando diversos equipos de trabajo conformados por médicos de diversas especialidades. Con medidas encaminadas a evitar el avance drástico de la enfermedad, se puede aumentar la calidad de vida del paciente neuromuscular, así como de sus familiares. Con la implementación del diagnóstico molecular de ENM, es necesario el establecimiento

de programas de detección de portadores de padecimientos específicos, acompañados de prácticas de asesoramiento genético adecuado, la planificación familiar de forma segura y asistida, el apoyo psicológico, así como planes de reincorporación social y laboral. Para ello es importante corroborar la anamnesis y asociar el examen clínico con estudios moleculares

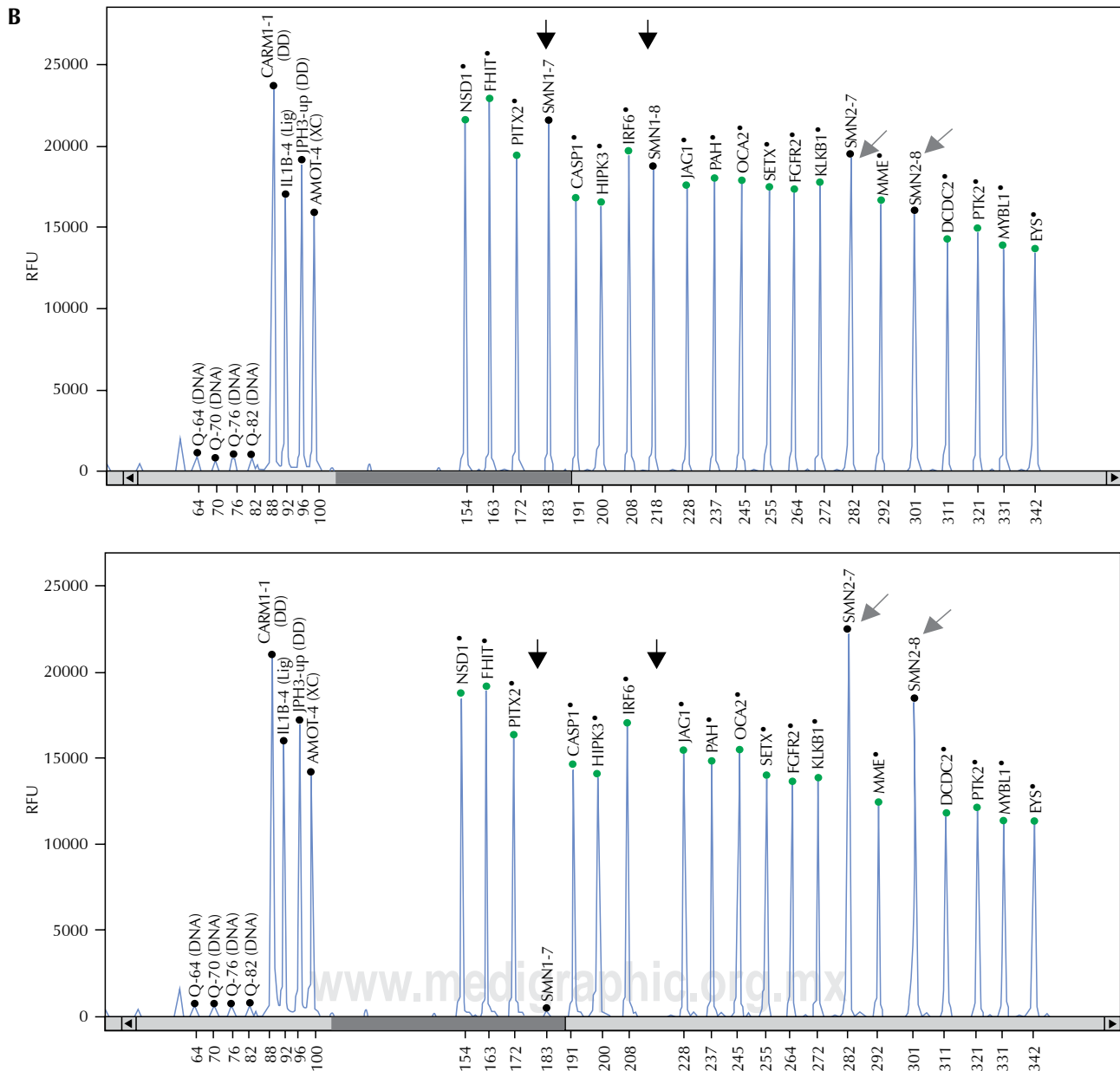


Figura 3B. Electroferogramas de los productos de amplificación de la reacción de MLPA para un individuo sano (imagen superior) y un paciente con SMA (imagen inferior). En comparación con el control sano, en el enfermo se observa la ausencia de los picos correspondientes a los exones 7 y 8 del gen *SMN1* (flechas negras) y un aumento en la señal correspondiente a los exones 7 y 8 del gen *SMN2* (flechas grises), lo que confirma el diagnóstico de SMA.

y genéticos de manera integral. Tanto el diagnóstico clínico como la implementación de pruebas moleculares y genéticas han sido producto del arduo trabajo y esfuerzo de diversos departamentos del INR en colaboración con otras instituciones del país como el INNN, el CMN 20 de Noviembre, el CRIS-DIF de Veracruz y el Hospital General de Durango, lo que ha permitido que la identificación de las ENM sea más eficiente en tiempo y calidad.

Como se observó, de 902 estudios genéticos en individuos con características clínicas de ENM, se confirmó el diagnóstico en el 70.51% de los casos, lo cual nos muestra que el programa de diagnóstico molecular ha sido un éxito en su etapa inicial. Sin embargo, hay que considerar que muchos pacientes de ENM no fueron candidatos para estos estudios, por lo que un gran número de ellos aún no conoce qué tipo de enfermedad padece. En esta primera etapa, el INR comienza a consolidarse como un centro de referencia que cuenta con el diagnóstico molecular de algunas de las ENM más frecuentes; sin embargo, aún existen metas más ambiciosas para abarcar un mayor número de pruebas moleculares para estos padecimientos, ya que un alto porcentaje de personas aún no cuentan con un diagnóstico molecular definitivo. Actualmente, nuestro grupo se encuentra trabajando en la implementación de nuevos diagnósticos como el síndrome de X frágil, distrofia muscular facioescapulohumeral, otros tipos de ataxia y CMT-X, así como realizando técnicas más sensibles para el diagnóstico de ENM, como MLPA para DMD.

Respecto a nuestros resultados, es importante mencionar la alta frecuencia de sujetos con DM1, lo cual se puede deber a que actualmente el INR es la única institución de salud pública que cuenta con el diagnóstico molecular en todo el país; dicho diagnóstico tiene un 100% de sensibilidad con la combinación de las técnicas de PCR y TP-PCR. En un estudio realizado recientemente en población mexicana, determinamos que en los individuos sanos de origen mestizo-mexicano se presenta una alta frecuencia de alelos largos normales (> 18 repetidos CTG), lo que sugiere que se podría presentar un alto número de casos, comparable a las poblaciones caucásicas y japonesas, en donde se ha determinado la mayor tasa de prevalencia de esta patología.²⁹ Esto coincide con la alta frecuencia de casos de DM1 reportados en este trabajo. En muchas poblaciones, la frecuencia de alelos normales largos correlaciona con una alta frecuencia de la enfermedad. Ante este panorama, en el INR se ha conformado una clínica de trabajo para la DM1, que incluye las áreas de rehabilitación física,

ortopedia, oftalmología, cardiología, rehabilitación cardiopulmonar, neurología, psicología, foniatría y audiología, entre otras.

En cuanto a las LGMD, los estudios de la expresión de proteínas por IFI y/o WB en músculo esquelético nos muestran que existe una alta frecuencia de pacientes con alteraciones en la expresión de disferlina (desde una reducción severa hasta su total ausencia), seguidas de sarcoglicanopatías—contrario a lo que se había reportado con anterioridad en México, donde después de las DMD/BDM, las sarcoglicanopatías ocupaban el segundo lugar en frecuencia.⁹ La razón de lo anterior se deriva de que, actualmente, el INR cuenta con una batería más amplia de anticuerpos y técnicas, así como personal altamente capacitado, lo cual ha permitido una mejor identificación y diagnóstico de las LGMD, con la capacidad de diferenciar neuropatías inflamatorias, metabólicas o mitocondriales de otras anomalías.

La determinación de la expresión de disferlina mediante IFI y WB a partir de biopsias musculares representa el criterio base para dar un diagnóstico positivo de disferlinopatías; sin embargo el análisis de la expresión de esta proteína en monocitos de sangre periférica mediante procedimientos de citometría de flujo se ha propuesto como una nueva alternativa adecuada, específica y rápida para su identificación como paso previo al diagnóstico genético confirmatorio.^{62,63}

Por su parte, el estudio molecular de SMA ha permitido confirmar el diagnóstico de esta condición particularmente relevante en la población infantil. De acuerdo con lo reportado en la literatura, con la metodología empleada por nuestro grupo se cubre cerca del 95% de los casos de SMA, detectando la alteración más frecuente, que corresponde a la delección del exón 7 del gen *SMN1*.^{31,32} Es importante señalar que el 5% constituido por los casos restantes presenta mutaciones puntuales o delecciones en otras regiones del gen *SMN1*, las cuales no son detectables con nuestro abordaje experimental. En este trabajo, se confirmaron el 50.5% de los casos analizados por sospecha diagnóstica de SMA. Este dato refleja la importancia del establecimiento de un diagnóstico diferencial como miastenia gravis, miopatías congénitas, esclerosis lateral primaria, esclerosis lateral amiotrófica, etcétera. De igual manera, la sospecha clínica puede no estar plenamente fundamentada; sin embargo, la falta de accesibilidad a pruebas diagnósticas adicionales puede invitar al médico especialista a realizar los ensayos disponibles. Por otra parte, con la implementación de técnicas como el MLPA, tenemos ahora la posibilidad de determinar de manera precisa el número de copias

del gen *SMN2*, como lo mencionamos previamente, un modificador de la enfermedad. Así mismo, tenemos la capacidad de detectar el estado portador de un individuo, lo cual, aunado al asesoramiento genético, permitirá un mejor tratamiento de las familias afectadas.

En relación a las SCA, es de gran relevancia su estudio en nuestro país, ya que en los últimos años se ha detectado un gran número de pacientes con este tipo de características. A pesar de que las SCA generalmente son clasificadas como enfermedades neurodegenerativas, como se puede observar en el Cuadro I, forman parte de las ENM, ya que afectan la integridad neuromuscular de los individuos. En este sentido, a pesar de ser considerada como una enfermedad huérfana, el tratamiento sintomatológico con algunos fármacos, acompañado de manera esencial de la rehabilitación física y neurológica, ha llevado a retrasar la progresión tan severa de este tipo de padecimientos. De acuerdo con nuestros resultados, la SCA2 y SCA3 son tipos muy comunes en nuestra población; sin embargo, el hallazgo de una población fundadora de SCA7 en la región sureste del país nos lleva a la necesidad de realizar un estudio a nivel nacional, ya que una muestra de la población no representa la magnitud del problema en nuestro país.^{45,46} Gracias al diagnóstico molecular multiplex que se realiza en nuestra institución, se puede realizar un filtro de las ataxias más representativas a nivel mundial, teniendo un resultado muy sensible y que se ha acoplado para su uso de manera rutinaria, convirtiéndonos en el líder en este tipo de diagnóstico en México. Cabe mencionar que con este diagnóstico se ha identificado a la serie de casos de SCA7 más grande a nivel mundial, lo que permitirá estudiar y caracterizar de manera más detallada dicha patología.^{45,46} Este es ejemplo claro de que el diagnóstico certero de una enfermedad nos permite identificar su comportamiento en nuestra población y el panorama que se necesita para su asistencia médica.

Por otra parte, aunque se conocen alrededor de 50 subtipos diferentes de CMT, CMT1A se considera la de mayor prevalencia en el mundo; por ello, para los pacientes con diagnóstico clínico de CMT es indispensable identificar la duplicación del gen *PMP22*. Cabe mencionar que hasta hace poco tiempo, el estudio molecular para detectar dicha duplicación se encontraba disponible únicamente en laboratorios privados a un elevado costo económico, por lo cual nuestro grupo de trabajo estableció y validó el diagnóstico molecular por qPCR. En ese sentido, es importante destacar que el INR fue la primera institución de salud pública donde se estableció este método para el diagnóstico

molecular de CMT1A. Dado que el INR es un centro de referencia para neuropatías hereditarias, el porcentaje de individuos con la duplicación reportado en el presente trabajo representa un valor aproximado de la frecuencia de CMT1A en sujetos mexicanos con características clínicas de CMT. De manera interesante, dicho porcentaje (47.3%) fue similar al que se ha reportado en poblaciones de España (42%), Estados Unidos (51.6%), Finlandia (52.5%) y Suecia (58.2%),⁶⁴⁻⁶⁶ sin embargo, existen diferencias estadísticamente significativas con otras poblaciones, como Japón (14.9%) y Rusia (33.9%).⁶⁷⁻⁶⁹ Tales semejanzas y diferencias pueden explicarse por el origen étnico de cada población, grado de ancestría y localización geográfica. Con respecto a los pacientes negativos para la duplicación, es necesario identificar la mutación causante de la patología por medio de la secuenciación de genes relacionada con CMT, como *PMP22*, *MPZ* y *GJB1*; también se puede considerar secuenciar el exoma completo de la persona mediante secuenciación de siguiente generación. Es importante resaltar que la detección de la duplicación de *PMP22* por medio de qPCR permitió realizar el diagnóstico molecular de CMT1A, lo cual es crucial para el asesoramiento genético y el manejo de los pacientes. Adicionalmente, en un futuro cercano, el diagnóstico oportuno de esta enfermedad podría permitir intervenciones tempranas, lo que ayudaría a evitar o reducir complicaciones relacionadas con discapacidad en nuestra población.

Finalmente, para mejorar estos diagnósticos se sigue trabajando en el desarrollo de técnicas básicas diagnósticas, así como de posibles tratamientos. En este sentido, parte de nuestras líneas de investigación tienen como objetivo estudiar mecanismos de patogénesis en modelos experimentales de DM1, DMD, SCA2 y SCA7, así como identificar potenciales blancos terapéuticos para estas patologías.

Conclusiones

El establecimiento del diagnóstico de un paciente con ENM es una labor complicada. La heterogeneidad clínica y genética de las ENM, en conjunto con el alto costo de los estudios especializados y la baja disponibilidad de centros de referencia, dificultan el diagnóstico certero del individuo con ENM. La implementación de técnicas moleculares para la detección de mutaciones específicas es determinante en el establecimiento del diagnóstico de las ENM. Una vez realizado, éste debe derivar en la creación de programas de detección de portadores de padecimientos específicos, acompañados de prácticas de

asesoramiento genético, planificación familiar, apoyo psicológico, y programas de reincorporación social y laboral. En este sentido, el INR puede ser un centro de referencia nacional para el diagnóstico y tratamiento multidisciplinario integral de este grupo de patologías.

Conflicto de intereses

No existen conflicto de intereses.

Bibliografía

1. INEGI. Censo de Población y Vivienda 2010, Cuestionario ampliado. Estados Unidos Mexicanos/Población con discapacidad.
2. Dubowitz V. Muscle disorders in childhood. 2nd ed. Vol. X. London; Philadelphia: Saunders; 1995. 540 p.
3. Kaplan, JC, Hamroun D. The 2015 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscul Disord*. 2014; 24 (12): 1123-1153.
4. Emery AE. The muscular dystrophies. *Lancet*. 2002; 359 (9307): 687-695.
5. Kaplan JC. The 2012 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders. *Neuromuscul Disord*. 2011; 21 (12): 833-861.
6. Deconinck N, Dan B. Pathophysiology of Duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol*. 2007; 36 (1): 1-7.
7. Udd B. Molecular biology of distal muscular dystrophies-sarcomeric proteins on top. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1772 (2): 145-158.
8. Kanagawa M, Toda T. The genetic and molecular basis of muscular dystrophy: roles of cell-matrix linkage in the pathogenesis. *J Hum Genet*. 2006; 51 (11): 915-926.
9. Gómez-Díaz B, Rosas-Vargas H, Roque-Ramírez B, Meza-Espinoza P, Ruano-Calderón LA, Fernández-Valverde F et al. Immunodetection analysis of muscular dystrophies in Mexico. *Muscle Nerve*. 2012; 45 (3): 338-345.
10. Schwartz M, Hertz JM, Sveen ML, Vissing J. LGMD2I presenting with a characteristic Duchenne or Becker muscular dystrophy phenotype. *Neurology*. 2005; 64 (9): 1635-1637.
11. Danieli GA, Mostacciuolo ML, Bonfante A, Angelini C. Duchenne muscular dystrophy. A population study. *Hum Genet*. 1977; 35 (2): 225-231.
12. Magri F, Govoni A, D'Angelo MG, Del Bo R, Ghezzi S, Sandra G et al. Genotype and phenotype characterization in a large dystrophinopathic cohort with extended follow-up. *J Neurol*. 2011; 258 (9): 1610-1623.
13. Ervasti JM. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1772 (2): 108-117.
14. Kalman L, Leonard J, Gerry N, Tarleton J, Bridges C, Gastier-Foster JM et al. Quality assurance for Duchenne and Becker muscular dystrophy genetic testing: development of a genomic DNA reference material panel. *J Mol Diagn*. 2011; 13 (2): 167-174.
15. Rani AQ, Sasongko TH, Sulong S, Bunyan D, Salmi AR, Zilfalil BA et al. Mutation spectrum of dystrophin gene in Malaysian patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *J Neurogenet*. 2013; 27 (1-2): 11-15.
16. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet*. 1989; 45 (4): 498-506.
17. Mahmood OA, Jiang XM. Limb-girdle muscular dystrophies: where next after six decades from the first proposal (Review). *Mol Med Rep*. 2014; 9 (5): 1515-1532.
18. Sewry CA. Muscular dystrophies: an update on pathology and diagnosis. *Acta Neuropathol*. 2010; 120 (3): 343-358.
19. Worton RG, Duff C, Sylvester JE, Schmickel RD, Willard HF. Duchenne muscular dystrophy involving translocation of the DMD gene next to ribosomal RNA genes. *Science*. 1984; 224 (4656): 1447-1449.
20. Ray PN, Belfall B, Duff C, Logan C, Kean V, Thompson MW et al. Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature*. 1985; 318 (6047): 672-675.
21. Thompson MW, Ray XM, Belfall B, Duff C, Logan C, Oss I et al. Linkage analysis of polymorphisms within the DNA fragment XJ cloned from the breakpoint of an X;21 translocation associated with X linked muscular dystrophy. *J Med Genet*. 1986; 23 (6): 548-555.
22. Monaco AP, Bertelson CJ, Colletti-Feener C, Kunkel LM. Localization and cloning of Xp21 deletion breakpoints involved in muscular dystrophy. *Hum Genet*. 1987; 75 (3): 221-227.
23. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*. 1988; 53 (2): 219-228.
24. Nouri N, Fazel-Najafabadi E, Salehi M, Hosseinzadeh M, Behnam M, Ghazavi MR et al. Evaluation of multiplex ligation-dependent probe amplification analysis versus multiplex polymerase chain reaction assays in the detection of dystrophin gene rearrangements in an Iranian population subset. *Adv Biomed Res*. 2014; 3: 72.
25. Magaña JJ, Leyva-García N, Cisneros B. Pathogenesis of myotonic dystrophy type 1. *Gac Med Mex*. 2009; 145 (4): 331-337.
26. Magaña JJ, Cisneros B. Perspectives on gene therapy in myotonic dystrophy type 1. *J Neurosci Res*. 2011; 89 (3): 275-285.
27. Meola G. Clinical aspects, molecular pathomechanisms and management of myotonic dystrophies. *Acta Myol*. 2013; 32 (3): 154-165.
28. Mahadevan M, Tsilfidis C, Sabourin L, Shutler G, Amemiya C, Jansen G et al. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science*. 1992; 255 (5049): 1253-1255.
29. Magaña JJ, Cortes-Reynosa P, Escobar-Cedillo R, Gómez R, Leyva-García N, Cisneros B. Distribution of CTG repeats at the DMPK gene in myotonic dystrophy

- patients and healthy individuals from the Mexican population. *Mol Biol Rep*. 2011; 38 (2): 1341-1346.
30. Schoser B, Timchenko L. Myotonic dystrophies 1 and 2: complex diseases with complex mechanisms. *Curr Genomics*. 2010; 11 (2): 77-90.
 31. Prior TW. Spinal muscular atrophy: a time for screening. *Curr Opin Pediatr*. 2010; 22 (6): 696-702.
 32. Piepers S, van den Berg LH, Brugman F, Scheffer H, Ruitkamp-Versteeg M, van Engelen BG et al. A natural history study of late onset spinal muscular atrophy types 3b and 4. *J Neurol*. 2008; 255 (9): 1400-1404.
 33. Monani UR, Sendtner M, Coover DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT et al. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 2000; 9 (3): 333-339.
 34. Gennarelli M, Lucarelli M, Capon F, Pizzuti A, Merlini L, Angelini C et al. Survival motor neuron gene transcript analysis in muscles from spinal muscular atrophy patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 213 (1): 342-348.
 35. Parsons DW, McAndrew PE, Iannaccone ST, Mendell JR, Burghes AH, Prior TW. Intragenic telSMN mutations: frequency, distribution, evidence of a founder effect, and modification of the spinal muscular atrophy phenotype by cenSMN copy number. *Am J Hum Genet*. 1998; 63 (6): 1712-1723.
 36. Velázquez-Pérez L, Hernández-Hernández O, Leyva-García N, Cortés H, Cisneros B, Magaña JJ. Ataxia espinocerebelosa tipo 2 (Parte A): epidemiología y características clínicas y genéticas. *Inv Disc*. 2014; 3 (3): 114-122.
 37. Durr A. Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *Lancet Neurol*. 2010; 9 (9): 885-894.
 38. Manto MU. The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). *Cerebellum*. 2005; 4 (1): 2-6.
 39. Matilla-Dueñas A, Sánchez I, Corral-Juan M, Dávalos A, Álvarez R, Latorre P. Cellular and molecular pathways triggering neurodegeneration in the spinocerebellar ataxias. *Cerebellum*. 2010; 9 (2): 148-166.
 40. Bird TD. Hereditary ataxia overview. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 (updated 2012).
 41. Magana JJ, Velázquez-Pérez L, Cisneros B. Spinocerebellar ataxia type 2: clinical presentation, molecular mechanisms, and therapeutic perspectives. *Mol Neurobiol*. 2013; 47 (1): 90-104.
 42. Alonso E, Martínez-Ruano L, De Biase I, Mader C, Ochoa A, Yescas P et al. Distinct distribution of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in the Mexican population. *Mov Disord*. 2007; 22 (7): 1050-1053.
 43. Teive HA. Spinocerebellar ataxias. *Arq Neuropsiquiatr*. 2009; 67 (4): 1133-1142.
 44. Velázquez-Pérez L, Cerecedo-Zapata CM, Hernández-Hernández O, Martínez-Cruz E, Tapia-Guerrero YS, González-Pina R et al. A comprehensive clinical and genetic study of a large Mexican population with spinocerebellar ataxia type 7. *Neurogenetics*. 2015; 16 (1): 11-21.
 45. Magana JJ, Tapia-Guerrero YS, Velázquez-Pérez L, Cerecedo-Zapata CM, Maldonado-Rodríguez M, Janolito JS et al. Analysis of CAG repeats in five SCA loci in Mexican population: epidemiological evidence of a SCA7 founder effect. *Clin Genet*. 2014; 85 (2): 159-165.
 46. Magana JJ, Gómez R, Maldonado-Rodríguez M, Velázquez-Pérez L, Tapia-Guerrero YS, Cortés H et al. Origin of the spinocerebellar ataxia type 7 gene mutation in Mexican population. *Cerebellum*. 2013; 12 (6): 902-905.
 47. Palau-Martínez F, Cuesta-Peredo A, Pedrola-Vidal L. Avances en la genética molecular de las neuropatías hereditarias. *Rev Neurol*. 2002; 35 (3): 246-253.
 48. Berciano J, Berciano NT, Combarros O. Original descriptions of peroneal muscular atrophy. *Muscle Nerve*. 2003; 28 (2): 251-252.
 49. Bouche P, Gherardi R, Cathala HP, Lhermitte F, Castaigne P. Peroneal muscular atrophy. Part 1. Clinical and electrophysiological study. *J Neurol Sci*. 1983; 61 (3): 389-399.
 50. Banchs I, Casasnovas C, Montero J, Volpini V, Martínez-Matos JA. Charcot-Marie-Tooth disease with intermediate conduction velocities caused by a novel mutation in the MPZ gene. *Muscle Nerve*. 2010; 42 (2): 184-188.
 51. Li J. Inherited neuropathies. *Semin Neurol*. 2012; 32 (3): 204-214.
 52. Pentao L, Wise CA, Chinault AC, Patel PI, Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication appears to arise from recombination at repeat sequences flanking the 1.5 Mb monomer unit. *Nat Genet*. 1992; 2 (4): 292-300.
 53. Russo M, Laurá M, Polke JM, Davis MB, Blake J, Brandner S et al. Variable phenotypes are associated with PMP22 missense mutations. *Neuromuscul Disord*. 2011; 21 (2): 106-114.
 54. Berciano J, Casasnovas C, Sivera R, Vilchez JJ, Infante J, Pelayo-Negro AL et al. Guía diagnóstica en el paciente con enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. *Neurología*. 2012; 27 (3): 169-178.
 55. Cortés H, Bautista-Tirado T, Escobar-Cedillo RE, Magaña JJ, Leyva-García N. Detección de la duplicación del gen PMP22 en pacientes con neuropatía periférica: estudio en la población mexicana. *Rev Neurol*. 2014; 59: 111-117.
 56. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Caskey CT. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy, in PCR protocols: a guide to methods and applications. In: M, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. San Diego: Academic Press; 1990. pp. 272-281.
 57. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet*. 1990; 86 (1): 45-48.
 58. Anderson LV, Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. *Am J Pathol*. 1999; 154 (4): 1017-122.
 59. Tomé S, Nicole A, Gomes-Pereira M, Gourdon G. Non-radioactive detection of trinucleotide repeat size variability. *PLoS Curr*. 2014; 6. doi: 10.1371/currents.md.ad50113b899fa1352ce70c087ead706.

60. Baris I, Etlík O, Koksál V, Arican-Baris ST. Rapid diagnosis of spinal muscular atrophy using tetra-primer ARMS PCR assay: simultaneous detection of SMN1 and SMN2 deletion. *Mol Cell Probes*. 2010; 24 (3): 138-141.
61. Cagnoli C, Stevanin G, Michielotto C. Large pathogenic expansions in the SCA2 and SCA7 genes can be detected by fluorescent repeat-primed polymerase chain reaction assay. *J Mol Diagn*. 2006; 8 (1): 128-132.
62. Wein N, Krahn M, Courrier S, Bartoli M, Salort-Campana E, Nguyen K et al. Immunolabelling and flow cytometry as new tools to explore dysferlinopathies. *Neuromuscul Disord*. 2010; 20 (1): 57-60.
63. Gallardo E, de Luna N, Diaz-Manera J, Rojas-García R, Gonzalez-Quereda L, Flix B et al. Comparison of dysferlin expression in human skeletal muscle with that in monocytes for the diagnosis of dysferlin myopathy. *PLoS One*. 2011; 6 (12): e29061.
64. Nicholson GA. Mutation testing in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Ann NY Acad Sci*. 1999; 883: 383-388.
65. Silander K, Meretoja P, Juvonen V et al. Spectrum of mutations in Finnish patients with Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies. *Hum Mutat*. 1998; 12: 59-68.
66. Holmberg BH, Holmgren G, Nelis E, van Broeckhoven C, Westerberg B. Charcot-Marie-Tooth disease in northern Sweden: pedigree analysis and the presence of the duplication in chromosome 17p11.2. *J Med Genet*. 1994; 31: 435-441.
67. Abe A, Numakura C, Kijima K, Hayashi M, Hashimoto T, Hayasaka K. Molecular diagnosis and clinical onset of Charcot-Marie-Tooth disease in Japan. *J Hum Genet*. 2011; 56: 364-368.
68. Mersyanova IV, Ismailov SM, Polyakov AV et al. Screening for mutations in the peripheral myelin genes PMP22, MPZ and Cx32 in Russian Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients. *Hum Mutat*. 2000; 15: 340-347.
69. Antonidi T, Majumdar A, Burton-Jones S, Williams M. Inherited peripheral neuropathies: Genetic testing in the diagnostic laboratory. *Neuromuscul Disord*. 2011; 21: 687-688.