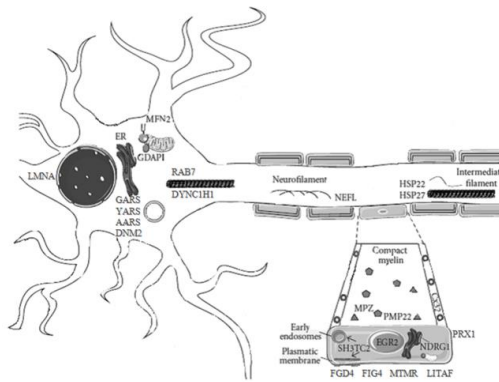


Distribución mutacional y correlación genotipo-fenotipo del síndrome de
Charcot-Marie-Tooth en la Comunidad Valenciana.



Doctorando: Rafael Sivera Mascaró

Directora de tesis: Maria Teresa Sevilla Mantecón.

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

2015

AGRADECIMIENTOS

A Teresa por todo el camino que me ha ayudado a recorrer durante estos años, y porque sencillamente sin ella esta tesis no hubiese sido posible.

A Juan porque aprender neuromuscular de él es un lujo del que siempre estaré agradecido.

Al resto del servicio de Neurología de La Fe, entré esperando compañeros y me llevo más de un amigo.

A Carmina y Paco por su trabajo y dedicación y por ser capaces de poner cordura en momentos de estrés.

Al resto de equipo del CIPF porque hacen que la medicina translacional sea un placer.

A mis amigos de Godella y de medicina por ser expertos oficiosos en CMT luego de la brasa que les he dado.

A mis padres y hermana, por ser uno de mis grandes apoyos y por ser en parte responsables del ‘gusanillo’ de querer ser un doctor sin comillas.

A Rafa y Marina por ser mi alegría y motivación, por poner esa cara seria cuando le explicaba que papa tenía que trabajar en la tesis.

A María, por compartir mi vida y mis preocupaciones, por quererme. Por todas las horas delante de ordenador y cuidando a los peques mientras yo estaba enfrascado.

ÍNDICE:

- 1) Introducción página 3
 - a. El nervio periférico
 - i. Estructura
 - ii. Conducción nerviosa
 - b. Neuropatía periférica
 - c. Polineuropatía hereditaria sensitiva y motora (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth o CMT)
 - i. Clasificaciones
 - ii. Mecanismos biológicos
 - iii. Características clínicas; correlación genotipo-fenotipo

- 2) Hipótesis de trabajo y objetivos página 77
 - a. Hipótesis de trabajo
 - b. Objetivos
 - i. Objetivo general
 - ii. Objetivos específicos

- 3) Material y métodos página 81
 - a. Población
 - b. Evaluación clínica
 - c. Protocolo neurofisiológico
 - d. Estudios anatomopatológicos

- e. Resonancia magnética muscular
- f. Análisis genéticos
- g. Aspectos éticos

4) Resultados

página 91

- a. Artículo I
- b. Artículo II
- c. Artículo III
- d. Artículo IV
- e. Algoritmos diagnósticos

5) Discusión

página 137

- a. Artículo I
 - i. Resumen de resultados
 - ii. Discusión
- b. Artículo II
 - i. Resumen de resultados
 - ii. Discusión
- c. Artículo III
 - i. Resumen de resultados
 - ii. Discusión
- d. Artículo IV
 - i. Resumen de resultados
 - ii. Discusión
- e. Algoritmos diagnósticos

6) Conclusiones	página 151
a. En castellano	
b. En inglés	
7) Bibliografía	página 157
8) Apéndice	página 191
a. Protocolo clínico del Hospital La Fe para pacientes con CMT	

ÍNDICE TABLAS Y FIGURAS:

Tablas:

- 1) Clasificación de los tipos de fibras nerviosas. página 5
- 2) Clasificación etiológica de las polineuropatías. página 10
- 3) Neuropatías hereditarias en el contexto de enfermedades multisistema. página 12
- 4) Clasificación de CMT axonales y desmielinizantes. página 15
- 5) Clasificación de CMT intermedias. página 16
- 6) Distribución mutacional en series clínicas representativas. página 27

Figuras

- 1) Estructura macroscópica del nervio periférico. página 4
- 2) Potencial de membrana. página 6
- 3) Potencial de acción muscular. página 7
- 4) Propagación del potencial de acción. página 8
- 5) Esquema de las proteínas patógenas implicadas en CMT y la diversidad de funciones. página 26
- 6) Paciente afecto de CMT1A. página 29
- 7) Anatomía patológica de nervio sural de un paciente con CMT1A. página 30
- 8) Atrofia de predominio en la eminencia tenar en un paciente varón con CMTX1 página 33

- 9) Corte semifino de un paciente con un neuropatía hipomielinizante congénita por mutación en MPZ. página 36
- 10) Paciente con mutaciones AR en GDAP1. página 39
- 11) Mujer joven con un fenotipo leve ocasionado por una mutación AD en GDAP1 página 40
- 12) Corte semifino de un paciente con una mutación en el gen *NEFL*. página 43
- 13) Algoritmo para el diagnóstico genético en CMT desmielinizante. página 131
- 14) Algoritmo para el diagnóstico genético en CMT intermedio. página 132
- 15) Algoritmo para el diagnóstico genético en CMT axonal. página 133

ABREVIATURAS EMPLEADAS:

AD: autosómico dominante

ADN: ácido desoxirribonucleico

AED: atrofia espinal distal

AR: autosómico recesivo

cDNA: ADN complementario

CIDP: polineuropatía inflamatoria desmielinizante crónica

CK: creatinquinasa

CMAP: potencial de acción muscular compuesto

CMT: enfermedad de Charcot-Marie-Tooth

CMTNS: CMT Neuropathy Score

CMTNS2: CMT Neuropathy Score segunda version

dHMN: neuropatía hereditaria motora distal

DHPLC: Denaturing High Performance Liquid Chromatography

D/I: derecha/izquierda

EMG: electromiograma

FDS: Functional Disability Scale

HC: historia clínica

H-H: transmisión hombre-hombre

HSAN: neuropatía hereditaria sensitiva y autonómica

HTA: hipertensión arterial

LCR: líquido cefalorraquídeo

MID: miembro inferior derecho

MII: miembro inferior izquierdo

MMII: miembros inferiores

MMSS: miembros superiores

MCR: Medical Research Council

MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

MSD: miembro superior derecho

MSI: miembro superior izquierdo

NHPP: neuropatía hereditaria con predisposición a parálisis por compresión

NARP: neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa

ORF: open reading frame

PCR: Polymerase Chain Reaction

PESS: potenciales evocados somatosensoriales

R. aquileo: reflejo aquileo

RCP: reflejo cutáneoplantar

RM: resonancia magnética

R. rotuliano: reflejo rotuliano

SNC: sistema nervioso central

STIR: Short T1 Inversion Recovery

VC: velocidad de conducción

VCMM: velocidad de conducción motora del nervio mediano

vHIT: video impulse test

1) INTRODUCCIÓN

a) El nervio periférico

El sistema nervioso está constituido por el sistema nervioso central (SNC) (encéfalo y médula espinal) y el sistema nervioso periférico (raíces nerviosas, nervios periféricos, unión neuromuscular y músculos). Los nervios periféricos son las estructuras nerviosas que conducen el estímulo eléctrico entre los órganos periféricos y el sistema nervioso central. Dicho estímulo puede ser aferente, si viaja de la periferia al encéfalo (por ej. estímulos sensitivos) o eferente, si viaja desde el sistema nervioso central al órgano efector (por ej. estímulos motores). La mayoría de nervios periféricos contienen fibras nerviosas motoras, sensitivas y vegetativas y, por tanto, conducen tanto estímulos aferentes como eferentes.

i. Estructura:

Los nervios periféricos son estructuras cordonales compuestas por un conjunto de fibras nerviosas agrupadas en fascículos y rodeadas por una membrana llamada epineuro. Los fascículos nerviosos están delimitados por una membrana denominada perineuro y están compuestos por fibras nerviosas y tejido conectivo (endoneuro). Las fibras nerviosas están formadas por el axón de la neurona (motora, sensitiva o vegetativa) y la célula de Schwann. Se distinguen fibras nerviosas mielínicas si el axón está envuelto por prolongaciones de células de Schwann formando vainas de mielina y amielínicas si las células de Schwann están en contacto con varios axones sin llegar a formar mielina (fig. 1). La vaina de mielina proporciona aislamiento al axón del exterior, protegiéndolo de agentes nocivos y siendo importante también en el proceso de regeneración nerviosa tras una lesión (1).

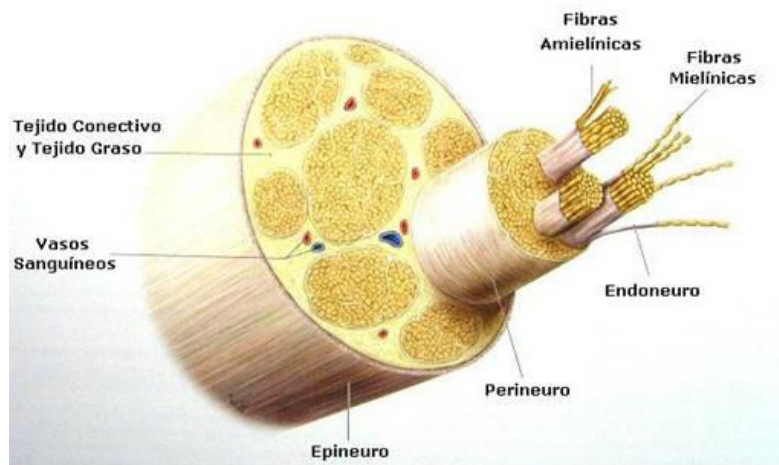


Figura 1: Estructura macroscópica del nervio periférico. Imagen adaptada de Texto y Atlas de Anatomía Prometheus, volumen 3. Versión: <http://www.med.ufro.cl>.

Las fibras nerviosas pueden clasificarse según la función que desempeñan, la presencia de mielina, el diámetro axonal o la velocidad de conducción (2) (tabla 1).

TIPO DE FIBRA		FUNCIÓN	DIÁMETRO (μm)	VELOCIDAD (m/s)
MIELÍNICAS				
A IA	α	Motor somático Propiocepción (husos musculares)	12-20	70-120
IB	α	Propiocepción (órganos de Golgi)	5-12	30-70
II	β	Tacto, presión	5-12	30-70
	γ	Motor (husos musculares)	3-6	15-30
III	δ	Dolor (rápido), frío, tacto	2-5	12-30
B		Preganglionares autonómicas	<3	3-15
AMIELÍNICAS				
C IV	Raíz dorsal	Dolor (lento), mecanorreceptores, temperatura	0.4-1.2	0.5-2
	Vegetativas	Postganglionares autonómicas	0.3-1.3	0.7-2.3

Tabla 1: Clasificación de los tipos de fibras nerviosas.

ii. Conducción nerviosa:

La conducción nerviosa es la transmisión de un estímulo eléctrico a lo largo de una fibra nerviosa. La misma se basa en que el axón nervioso está polarizado, es decir, mantiene una diferencia de potencial entre el interior y el exterior celular, y es excitable. Dicha diferencia de potencial se produce por distintas concentraciones iónicas extra e intracelulares (fig. 2). Ante el estímulo adecuado se produce un cambio en las concentraciones iónicas provocando la despolarización de la célula.

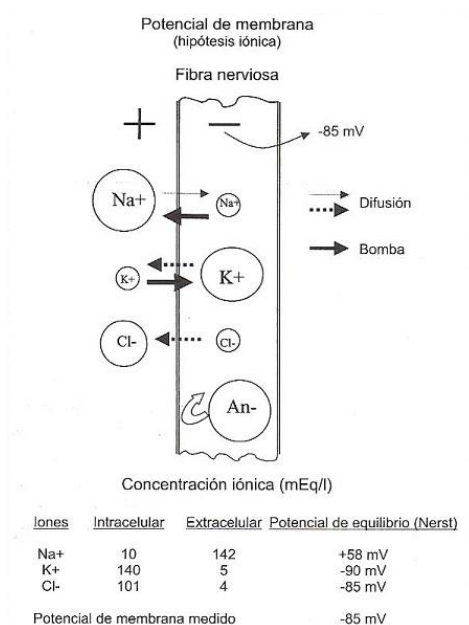


Figura 2: Potencial de membrana. Extraído de Manual de Electromiografía clínica. Prous science, S.A., 2000.

Si la despolarización de la membrana alcanza un umbral determinado (alrededor de -45 mV) se produce un potencial de acción, que provoca una despolarización de hasta +45 mV (fig. 3).

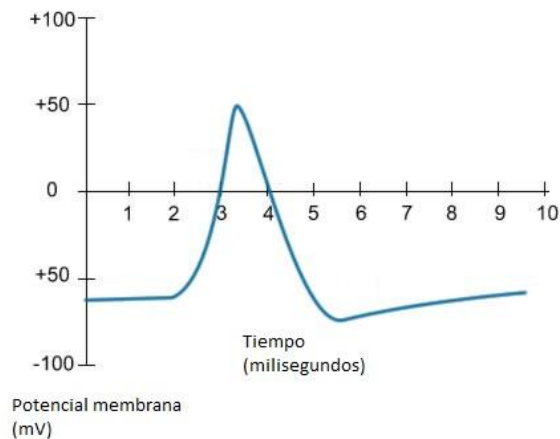


Figura 3: Potencial de acción muscular.

Dicha despolarización ejerce un estímulo sobre la membrana celular colindante, produciéndose una propagación del potencial de acción por la fibra nerviosa (fig. 4). La velocidad de propagación del potencial de acción por la fibra nerviosa se conoce como velocidad de conducción y depende, mayormente, del diámetro axonal y de la mielinización de la fibra nerviosa. En las fibras mielínicas el potencial de acción se propaga de una manera ‘saltatoria’, despolarizándose únicamente los espacios entre las vainas de mielina (nodos de Ranvier), siendo por tanto más rápida la conducción nerviosa. En cualquier caso, en ambos tipos de fibras, a mayor diámetro axonal, mayor velocidad de conducción.

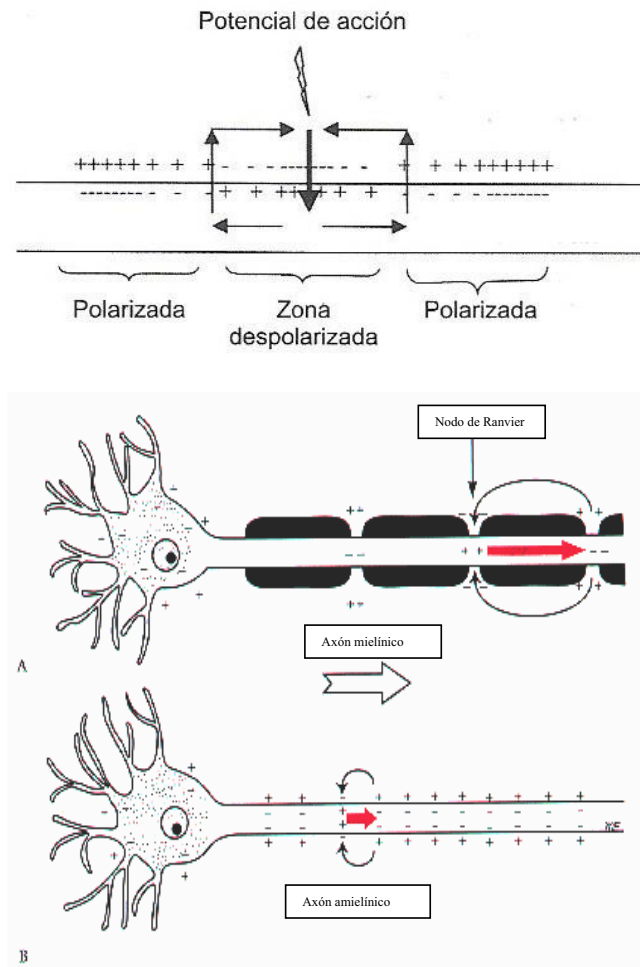


Figura 4: Propagación del potencial de acción y conducción nerviosa en fibras mielínicas y amielínicas. Extraído de Manual de Electromiografía clínica. Prous science, S.A., 2000.

b) Neuropatía periférica

El término neuropatía periférica se refiere a una alteración de la función o de la estructura de las neuronas periféricas que componen la fibra nerviosa. Se trata de un grupo de enfermedades relativamente frecuentes con una incidencia anual estimada

entre 710-2384/100.000 habitantes (4, 5) y una prevalencia en España de cerca del 2-8% (6). La lesión puede producirse de una manera focal en un único nervio (mononeuropatía), indicando la presencia de un proceso local causante. También puede producirse un daño en distintas localizaciones de nervios no contiguos de una manera secuencial o simultánea. En este caso se conoce como mononeuropatía múltiple y la práctica totalidad de los casos tienen una etiología adquirida, habitualmente, con una fisiopatología inflamatoria (sistémica o local), infecciosa, o infiltrativa (7).

Cuando la lesión del nervio periférico se produce de una manera bilateral y simétrica, se conoce como polineuropatía. Clínicamente, cursa con déficits motores, sensitivos y/o vegetativos simétricos con mayor afectación distal que proximal. El abanico etiológico en este tipo de enfermedades es extremadamente amplio (tabla 2) y para tratar de acotarlo es importante tener en cuenta la rapidez de instauración y determinar si el daño inicial se produce en el axón nervioso o en la mielina circundante (polineuropatías axonales y desmielinizantes respectivamente) (8). Para esto último es necesaria la realización de estudios electrofisiológicos de conducción nerviosa y, en ocasiones, electromiografía de aguja (9, 10).

	AXONAL	DESMIELINIZANTE
AGUDA	<p>Inflamatorias: Formas axonales del Síndrome de Guillain Barré</p> <p>Porfirias</p> <p>Tóxicos: Talio, organofosforados, taxol, etc.</p> <p>Fármacos: Vincristina, inhibidores de la transcriptasa inversa, etc.</p>	<p>Inflamatoria: Síndrome Guillain-Barré</p> <p>Infecciosa: Difteria</p> <p>Tóxicos: Arsénico, suramida, etc.</p>
CRÓNICA	<p>Diabetes Mellitus</p> <p>Alcohol</p> <p>Sistémicas: uremia, hepatopatía, hipotiroidismo</p> <p>Infecciones: VIH, lepra, enf. De Lyme</p> <p>Tóxicos: Plomo, mercurio, arsénico, organofosforados, talio, acrilamida, etc.</p> <p>Fármacos: isoniacida, amiodarona, fenitoína, vincristina, metronidazol, talidomida, etc.</p> <p>Deficiencias de vits. B1, B6, B12, E</p> <p>Asociadas a disproteinemia</p> <p>Amiloidosis primaria</p> <p>Hereditarias</p> <p>Paraneoplásicas</p> <p>Idiopáticas</p>	<p>Inflamatoria: Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), neuropatía motora multifocal</p> <p>Asociadas a disproteinemia</p> <p>Amiloidosis primaria</p> <p>Fármacos: amiodarona</p> <p>Hereditarias</p> <p>Paraneoplásicas</p> <p>Hepatopatía crónica</p> <p>Diabetes mellitus</p> <p>Hipotiroidismo</p>

Tabla 2: Clasificación etiológica de las polineuropatías.

En las polineuropatías hereditarias el agente causal que provoca la aparición de la enfermedad es un defecto genético. A medida que se ha desarrollado la genética molecular, el conocimiento sobre las mismas se ha ido multiplicando y el número de genes y mutaciones causales descritas ha aumentado exponencialmente. En cualquier caso, cabe diferenciar las neuropatías hereditarias en las que la neuropatía es la única o principal manifestación de la enfermedad, de aquellas en las que forma parte de una constelación más amplia de manifestaciones neurológicas o sistémicas (tabla 3). En el primero de estos grupos se distinguen neuropatías hereditarias con afectación sensitiva y motora (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth o CMT), otras con afectación exclusivamente motora (neuropatía hereditaria motora distal o dHMN), y aquellas con afectación exclusivamente sensitiva y autonómica (neuropatía hereditaria sensitiva y autonómica o HSAN). Aparte, existen 2 entidades con un curso recurrente o paroxístico: neuropatía hereditaria con predisposición a las parálisis por compresión (NHPP) y la neuralgia amiotrófica hereditaria (11). El segundo grupo está resumido en la tabla 3.

Polineuropatía amiloidótica familiar	Asociada a ataxia cerebelosa
<ul style="list-style-type: none"> – Por mutaciones en el gen de la transtirretina (Tipo 1 y 2) – Tipo 3 (Van Allen) – Tipo 4 (Finlandesa) 	<ul style="list-style-type: none"> – Con herencia autosómico recesiva (ataxia de Friedrich, ataxia con apraxia óptica tipo 1 y 2, ataxia asociada a déficit de vitamina E, Ataxia espástica AR de Charlevoix Saguenay...) – Con herencia autosómico dominante
Enfermedad del mecanismo lipídico	Porfiria
<ul style="list-style-type: none"> – Leucodistrofias (leucodistrofia metacromática, adrenomielseuropatía) – Alteraciones metabólicas del ácido fitánico (enf. Refsum) – Deficiencias de lipoproteínas – Deficiencia de α-galactosidasa (enf. Fabry) – Alteración del metabolismo del colestanol 	<ul style="list-style-type: none"> – Aguda intermitente – Coproporfiria – Variegata – Deficiencia de ALA deshidrogenasa
Alteración de la reparación del ADN	Misceláneo
<ul style="list-style-type: none"> – Ataxia telangiectasia – Xeroderma pigmentosum – Síndrome de Cockayne 	<ul style="list-style-type: none"> – Neuroacantocitosis
Asociadas con enfermedades mitocondriales	

Tabla 3: Neuropatías hereditarias en el contexto de enfermedades multisistema.

a. Polineuropatía hereditaria sensitiva y motora (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth)

El síndrome de Charcot-Marie-Tooth (CMT) es el epónimo con el que se conoce a las polineuropatías hereditarias sensitivas y motoras. Es la forma de neuropatía hereditaria más frecuente, con una prevalencia global descrita entre 15,2-40 casos/100.000 habitantes (12, 13). En España, la prevalencia estimada es de 28.2 casos/100.000 habitantes gracias a un estudio epidemiológico realizado en la región de Cantabria (14).

Se trata de un conjunto heterogéneo de enfermedades. En estos momentos ya se conocen mutaciones causales en más de 70 genes o loci y este número está constantemente ampliándose (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/>, <http://neuromuscular.wustl.edu/>). La herencia de la enfermedad puede ser autosómico dominante (AD), autosómico recesiva (AR) o ligada al cromosoma X (dominante o recesiva). Incluso hay genes, como el *GDAP1*, en el que determinadas mutaciones se heredan de forma AD y otras de forma AR (15, 16).

El curso clínico es variable y depende tanto de la mutación subyacente como de otras variables epigenéticas y/o ambientales. Como conjunto, la enfermedad suele tener un inicio infantil o juvenil, apareciendo debilidad e hipoestesia distal progresiva en las extremidades, disminución o abolición de los reflejos profundos y ciertas deformidades óseas distales (pies cavos, dedos en martillo, etc.) (17).

i. Clasificaciones:

Desde su descubrimiento, el enfoque de esta enfermedad ha ido evolucionando sustancialmente, sobre todo con el desarrollo del conocimiento de la medicina molecular. En cualquier caso, la clasificación actual parte de los estudios de Dyck y Lambert, y posteriormente de Harding y Thomas, que se basaban en las características clínicas, neurofisiológicas e histológicas (18,19). Así se diferencian 2 grandes grupos, que siguen estando vigentes:

1) CMT desmielinizante (CMT1 si tiene una herencia AD y CMT4 si es AR): Existe un enlentecimiento de las velocidades de conducción (VC) en los estudios de conducción nerviosa con amplitudes normales y/o en la biopsia de nervio sural se observa desmielinización y proliferación de células de Schwann formando estructuras concéntricas denominadas bulbos de cebolla.

2) CMT axonal (CMT2): Existe una caída de la amplitud de potenciales, sin enlentecimiento de las velocidades de conducción y/o la patología muestra hallazgos de degeneración y regeneración axonal.

Se acordó que el límite de separación entre ambos grupos podía establecerse considerando la velocidad de conducción nerviosa motora del nervio mediano (VCMM). Si esta es menor a 38 m/s se considera CMT desmielinizante y si es $>$ a 38 m/s se considera una variante axonal (19).

3) CMT intermedia: Se trata de un término útil a nivel práctico pero difícil de definir con exactitud. Generalmente, se considera que una familia con CMT es intermedia si sus miembros tienen una VCMM entre 30-45 m/s (20). Los hallazgos patológicos son variables pudiendo mostrar características axonales y/o desmielinizantes.

El desarrollo de las técnicas de genética molecular ha revolucionado el campo de las neuropatías hereditarias, descubriéndose en los últimos 20 años la gran heterogeneidad genética que subyace a este síndrome. A día de hoy, se han descrito más de 70 genes cuya disfunción puede causar CMT y la lista continúa creciendo. Por este motivo, el diagnóstico molecular se incorporó a la clasificación de la enfermedad, utilizando letras consecutivas que corresponden con los distintos genes o locus responsables (21). Dicha clasificación actualizada puede observarse en las tablas 4 y 5 adaptadas de (22).

	Subtipo	Gen	Herencia	OMIM		Subtipo	Gen	Herencia	OMIM
CMT1/ CMT4	CMT1A	<i>PMP22</i>	AD	601097	CMT2	CMT2A1	<i>KIF1B</i>	AD	605995
	CMT1B	<i>MPZ</i>	AD	159440		CMT2A2	<i>MFN2</i>	AD	608507
	CMT1C	<i>LITAF</i>	AD	603795		CMT2B	<i>RAB7</i>	AD	602298
	CMT1D	<i>EGR2</i>	AD	129010		CMT2B1	<i>LMNA</i>	AR	150330
	CMT1E	<i>PMP22</i>	AD	601097		CMT2B2	<i>MED25</i>	AR	610197
	CMT1F	<i>NEFL</i>	AD	162280		CMT2C	<i>TRPV4</i>	AD	605427
		<i>FBLN5</i>	AD	614434		CMT2D	<i>GARS</i>	AD	600287
						CMT2E	<i>NEFL</i>	AD	162280
	CMT4A	<i>GDAP1</i>	AR	606598		CMT2F	<i>HSPB1</i>	AD	602195
	CMT4B1	<i>MTMR2</i>	AR	603557		CMT2G	12q-q13.2		
	CMT4B2	<i>MTMR13</i>	AR	607697		CMT2H	<i>GDAP1</i>	AR	606598
	CMT4B3	<i>MTMR5</i>	AR	603560		CMT2I/J	<i>MPZ</i>	AD	159440
	CMT4C	<i>SH3TC2</i>	AR	608206		CMT2K	<i>GDAP1</i>	AD	606598
	CMT4D	<i>NDRG1</i>	AR	605262		CMT2L	<i>HSPB8</i>	AD	608014
	CMT4E	<i>ERG2</i>	AR	129010		CMT2M	<i>DNM2</i>	AD	602378
	CMT4E	<i>MPZ</i>	AR	159440		CMT2N	<i>AARS</i>	AD	601065
	CMT4F	<i>PRX1</i>	AR	605725		CMT2O	<i>DYNC1H1</i>	AD	600112
	CMT4G	<i>HK1</i>	AR	142600		CMT2P	<i>LRSAMI</i>	AD/AR	610933
	CMT4H	<i>FGD4</i>	AR	611104		CMT2Q	<i>DHTKD1</i>	AD/AR	610933
	CMT4J	<i>FIG4</i>	AR	609390			<i>TFG</i>	AD	602498
					<i>MARS</i>	AD	156560		
					<i>HARS</i>	AD	142810		
					<i>HINT1</i>	AR	601314		
					<i>TRIM2</i>	AR	614141		
					<i>MT-ATP6</i>	Mitoc			

Formas intermedias							
	Subtipo	Gen	OMIM		Subtipo	Gen	OMIM
Herencia AD	CMT-DIA	1q24.1-25.1		Herencia ligada al X	CMTX1	<i>GJB1</i>	304040
	CMT-DIB	<i>DNM2</i>	602378		CMTX2	Xp22.2	302801
	CMT-DIC	<i>YARS</i>	603623		CMTX3	Xq26-28	302802
	CMT-DID	<i>MPZ</i>	159440		CMTX4	<i>AIFM1</i>	310490
	CMT-DIE	<i>INF2</i>	610982		CMTX5	<i>PRPS1</i>	311850
	CMT-DIF	<i>GNB4</i>	610982		CMTX6	<i>PKD3</i>	300906
Herencia AR	CMT-RIB	<i>KARS</i>	601421				
	CMT-RIC	<i>PLEKHG5</i>	611101				

Tablas 4 y 5: Clasificación actualizada de CMT con genotipo subyacente y OMIM.

La complejidad genética del CMT no sólo radica en el número de genes implicados, sino también en la variabilidad fenotípica de muchos de ellos y el solapamiento con otras enfermedades. De hecho, hay varios genes (*MPZ*, *NEFL*, etc.) en los que existen mutaciones que provocan fenotipo axonal y otras desmielinizante (23). En otros, como el *GDAP1*, existen mutaciones con herencia AD y otras con herencia AR, con fenotipos muy diferenciados (15, 16). Por último, hay genes que están implicados en otros tipos de neuropatías hereditarias, como el *GARS* cuya disfunción también puede producir una neuropatía hereditaria motora distal (24) o incluso con otras enfermedades hereditarias neurológicas como las paraparesias espásticas (25).

Dichos descubrimientos han provocado un aumento del espectro de mecanismos biológicos que subyacen a estas enfermedades, así como una continua renovación del conocimiento sobre las características clínicas, y la correlación genotipo-fenotipo.

ii. Mecanismos biológicos:

Los mecanismos biológicos causantes de CMT son una gran fuente de conocimiento sobre el funcionamiento de la fibra nerviosa. La heterogeneidad genética subyacente a la

enfermedad implica que existe una gran variedad de mecanismos que pueden alterar la transmisión nerviosa y provocar enfermedad. Se podría pensar que los genes implicados en CMT desmielinizante codificarán exclusivamente para proteínas integradas en la mielina, y que los que causan CMT2 codificarán proteínas axonales, pero realmente el escenario es mucho más complejo (26). Los mecanismos se pueden agrupar en:

1. Estructurales de la mielina:

Se han descrito alteraciones en 3 genes que codifican para proteínas con funciones estructurales mielínicas, siendo lo más frecuente las mutaciones en *PMP22* (CMT1A, CMT1E y NHPP). Dicho gen codifica una proteína de 22 KD que compone el 2-5% de la mielina compacta de la fibra nerviosa. Se produce principalmente en las células de Schwann y aunque su función exacta no se conoce parece ejercer su papel en el crecimiento y diferenciación de la mielina (27). Lo que está claro es que tanto el exceso como el defecto de la producción de dicha proteína ejerce un efecto deletéreo sobre la estructura mielínica. La presencia de una duplicación en 17p11.2 que contiene el gen *PMP22* causa el subtipo CMT1A, la variante de CMT más frecuente (28). Habitualmente la duplicación genética es de 1.5 Mb, si bien se han descrito duplicaciones con un menor número de pares de bases y, recientemente, se ha demostrado que un pequeño porcentaje se debe a una triplicación (29, 30). En cualquier caso, el exceso de producción de proteína *PMP22* en las células de Schwann causa una acumulación de agregados proteicos, lo que provoca un aumento del estrés en el retículo endoplásmico y, finalmente, la apoptosis de la célula (31).

Pese a que la alteración inicialmente aparece en la mielina, a medida que avanza la enfermedad se produce un daño secundario del axón subyacente y una degeneración axonal de la fibra nerviosa. Este proceso secundario pone de manifiesto la importancia de

la interacción célula de Schwann-axón y es el responsable de la disminución de la fuerza y sensibilidad propias de esta enfermedad (32).

Si, en vez de una duplicación, existe una delección de una región del cromosoma 17p11.2 que incluye el gen *PMP22*, se produce un cuadro de neuropatía hereditaria con predisposición a las parálisis por compresión (NHPP) (33). En este caso, la delección genética se traduce en una menor expresión en la proteína PMP 22, lo cual produce anomalías estructurales mielínicas (34). Se postula que esto produce una alteración de la excitabilidad nerviosa y una predisposición a desarrollar bloqueos de conducción ante estímulos mecánicos (35). Un pequeño porcentaje de NHPP se debe a mutaciones puntuales en *PMP22*, especialmente aquellas que causan un codón stop (36). El resto de mutaciones puntuales en *PMP22* que causan CMT se agrupan bajo el epígrafe CMT1E, las cuales son poco frecuentes y tienen un fenotipo algo variable (37).

Las mutaciones en el gen *MPZ* producen una alteración de la transcripción de la proteína mayor 0 (MP0), que compone cerca del 50% de las proteínas mielínicas y es esencial para la estructura y la función de la mielina (38).

Ya se han descrito más de 150 mutaciones que pueden provocar la enfermedad, y estas se pueden agrupar en aquellas que asocian un fenotipo con una desmielinización evidente desde la infancia (CMT1B) y en las que aparece una neuropatía de inicio tardío en la que predomina la degeneración axonal secundaria a la alteración mielínica (CMT-DID, CMT2I/J) (39). Los mecanismos moleculares subyacentes a las diversas mutaciones son variados y, recientemente, se ha postulado que las variaciones fenotípicas en estos pacientes se podrían deber a un efecto de 'dosis genética', como también ocurría en el *PMP22* (40).

Las mutaciones en el gen *GJB1* del cromosoma X producen una alteración de la transcripción de conexina 32 (Cx32), una proteína de unión tipo 'gap junction' importante

en la mielina no compacta, y causan CMTX1 (41). La Cx32 es esencial en esa localización para formar vías de comunicación radiales a través de las distintas vainas de mielina que son fundamentales para la correcta interacción e intercambio de moléculas con el axón. Existen más de 300 mutaciones causantes de CMTX1, con muy diversos mecanismos de acción, pero todos ellos producen una alteración de la función normal de la proteína (42). Se trata del segundo subtipo genético más frecuente y uno de los que tiene mayor variabilidad fenotípica. Pese a ello, aún no se ha podido establecer con exactitud una correlación consistente entre el tipo o localización de la mutación y el fenotipo.

2. Estructura y transporte axonal:

Las alteraciones de proteínas estructurales axonales y del transporte de moléculas a lo largo del axón pueden causar CMT. Una de las proteínas citoesqueléticas más relevantes para el mantenimiento de la estructura celular y transporte axonal son los neurofilamentos citoplásmicos. Las mutaciones en el gen neurofilament light chain (*NEFL*), que codifica para una proteína estructural de los neurofilamentos intermedios, se asocian con varios subtipos de CMT, fundamentalmente axonales (CMT2E) (43). Curiosamente, se han descrito varios casos con mutaciones en este gen en el que la neuropatía tiene signos desmielinizantes neurofisiológicos y anatomopatológicos (CMT1F) (44). En estos casos, los signos de alteración de la mielina pueden deberse tanto a una disrupción de la interacción célula de Schwann-axón, como a que la alteración del citoesqueleto axonal se traduce en axones más finos y, por tanto, con menor velocidad de conducción (45).

Las heat shock proteins (HSP) son unas macromoléculas de tipo chaperonas que, sin ser proteínas estructurales, sí que actúan sobre los neurofilamentos axonales. Las mutaciones en *HSPB8* y *HSPB1*, que codifican para HSP22 y HSP27 respectivamente se han

asociado a 2 tipos de CMT axonales (CMT2L y CMT2F) y también a neuropatía hereditaria motora distal (46, 47). En ambos casos, la alteración en la afinidad de la HSP por los neurofilamentos intermedios axonales causa una disrupción del ensamblaje de los mismos, un fallo en el transporte axonal y una susceptibilidad a padecer daños por agentes externos (48).

Las dineínas son unas proteínas importantes para el transporte axonal retrógrado y, recientemente, se ha descubierto que las mutaciones en *DYNC1H1*, que codifica la cadena pesada 1 de la dineína, pueden producir CMT axonal (CTM2O), así como una variante de atrofia muscular espinal (49, 50). Por otro lado, las kinesinas son unas proteínas motoras que ejercen su función en el transporte axonal anterógrado, y las mutaciones en *KIF1* se han descrito como causantes de CMT2A1 (51).

3. Dinámica mitocondrial:

La producción energética en las mitocondrias es esencial para el funcionamiento de la fibra nerviosa por su extraordinaria longitud y requerimientos energéticos. Las mutaciones en el gen *MFN2*, cuyo transcrito es una GTP-asa de la pared externa mitocondrial, causan la forma axonal más frecuente: CMT2A2 (52). En estos pacientes, se ha observado una variabilidad mutacional muy amplia que condiciona una disfunción en la fusión mitocondrial, alterando la interacción de las mitocondrias con el retículo endoplásmico y el transporte axonal de las propias mitocondrias (53).

Las mutaciones en el gen *GDAP1* también provocan una alteración en la dinámica y función mitocondrial en la fibra nerviosa. Se han descrito mutaciones en todos los exones del gen que pueden heredarse de manera AD o AR con fenotipo claramente diferenciado (15, 16). La proteína GDAP1 es una enzima glutatión S-transferasa que se encuentra en la membrana externa mitocondrial localizada en el axón y, en menor medida, en la célula de

Schwann, y su alteración provoca una disfunción del proceso de fisión mitocondrial (54). La mayoría de los pacientes presentan un fenotipo axonal con una herencia AR o AD (CMT2H) aunque, habitualmente, se encuentra alguna alteración mielínica anatomopatológica, y se han descrito casos con fenotipo desmielinizante y herencia AR (CMT4A) (55).

Recientemente, se ha demostrado que las mutaciones en el gen *MT-ATP6* del ADN mitocondrial pueden ser una causa poco común de CMT2 (56). Este gen codifica para la subunidad ATP6 de la ATP sintetasa mitocondrial y, en estos pacientes, se produce una alteración de la función del complejo V, y una disminución en la producción mitocondrial de ATP. Las mutaciones en dicho gen pueden tener un fenotipo muy diverso, que va desde el síndrome de Leigh, a parálisis periódicas, o necrosis estriatal (57).

4. Síntesis, distribución y degradación de proteínas:

El proceso de síntesis, distribución y degradación de proteínas debe estar perfectamente regulado para asegurar la integridad y función de los componentes membranosos de la mielina y el axón (58). Por ello, no es de extrañar que mutaciones en genes encargados de regular estos procesos puedan provocar distintos subtipos de CMT.

Se han descrito varios genes implicados en CMT y estrechamente ligados a la síntesis proteica. En muchas ocasiones codifican para una aminoacil t-RNA sintetasa, enzimas que cargan aminoácidos al t-RNA en el primer proceso de transcripción proteica. Pese a estar localizadas en todo el organismo, las mutaciones de los genes *GARS*, *YARS*, *AARS*, *KARS*, *MARS* y *HARS* tienen una predilección por afectar el axón nervioso y causar CMT. Por ejemplo, las mutaciones en *GARS* afectan a una glicil t-RNA sintetasa, causando CMT2N o una neuropatía hereditaria motora distal (24), las mutaciones en *YARS* afectan

a una tirosil t-RNA sintetasa ocasionando CMT-DIC (59), y las mutaciones en *AARS* afectan a una alanin t-RNA sintetasa y producen CMT2N (60).

Existe una serie de genes implicados en la degradación y distribución proteica que son una causa rara de CMT. Las mutaciones en el gen *LITAF*, que codifica para la ubiquitin ligasa SIMPLE, pueden provocar CMT1C (61). La función de la proteína no se conoce con exactitud pero, aparentemente, regula la distribución y el tráfico endosoma-lisosoma proteico sobre todo en la célula de Schwann (62).

Las mutaciones en los genes *MTMR2*, *MTMR13* (*SBF2*) y *MTMR5* (*SBF1*) pueden provocar CMT4B1, CMT4B2 y CMT4B3, respectivamente (63, 64, 65, 66). Dichos genes codifican para tres subtipos de miotubularina, una fosfatasa localizada principalmente en la célula de Schwann que ejerce su función en la endocitosis, distribución y degradación proteica. Las mutaciones en dichos genes se heredan de manera recesiva y causan una variante grave con plegamientos anómalos mielínicos. Las mutaciones en el gen *FIG4*, que codifica para otra fosfatasa implicada en la regulación de la endocitosis, distribución y degradación proteica, también se ha descrito como causa de CMT4J (67). De hecho, se cree que la función de estos dos últimos genes está relacionada (68).

Por otro lado, se han descrito mutaciones causales en tres genes que codifican para GTP-asas relevantes en los primeros pasos de la endocitosis y la distribución proteica. El gen *DNM2* codifica para una GTP-asa grande llamada dinamina 2 que realiza su función en las primeras fases de la endocitosis. Las mutaciones en dicho gen pueden causar CMT con un fenotipo intermedio (CMT-DIB) o axonal (CMT2M), y también una miopatía centronuclear dominante, según la localización y tipo de la mutación (69, 70). Las mutaciones en el gen *RAB7* se relacionan con CMT2B por la alteración de la función de su transcrito, que forma parte de la familia de las GTP-asas pequeñas (71). La proteína Ras associated protein-7 es ubicua en el organismo, y ejerce su función en el tráfico de

membranas, especialmente en los endosomas tempranos y en el transporte endosomal-lisosoma (72). Las mutaciones en *FGD4* son una causa poco frecuente de CMT desmielinizante recesivo (CMT4H) (73). En este caso, el gen codifica para FRABIN, que actúa sobre Cdc42, una Rho GTP-asa importante en la endocitosis de la célula de Schwann, causando una alteración de la mielinización de los nervios en los primeros años de vida (74). La mielinización temprana también se ve afectada en los casos de CMT4C, por mutaciones recesivas en *SH3TC2* (75). Pese a que el mecanismo biológico no se conoce con exactitud, se ha visto que la proteína se localiza en los endosomas e interacciona con la GTPasa Rab 11 (76).

Más recientemente se han descrito mutaciones causales de CMT en el gen *LRSAMI*, que pueden heredarse de manera AD o AR y producen un fenotipo axonal (CMT2P) (77). Pese a que la función de la proteína no es conocida con exactitud, se trata de una E3 ubiquitin ligasa que, posiblemente, ejerce su función en el proceso de distribución proteica (78).

5. Integridad de membranas:

La integridad de las membranas intracelulares de la célula de Schwann o del axón puede verse afectada en algunos subtipos de CMT. Un ejemplo de ello es el CMT4F, causado por mutaciones autosómicas recesivas en el gen *PRX* (79, 80). Las dos isoformas de periaxina que son transcritas por este gen se localizan en la célula de Schwann y se encargan del anclaje entre la membrana basal y el citoesqueleto, lo cual es esencial para una correcta mielinización (81). Por otro lado, las mutaciones en el gen *LMNA*, que codifican para la lamina A/C, pueden causar CMT2B1 (82). Las laminas son una proteínas integrales de la membrana nuclear que se expresan en todas las células, y su alteración puede conducir a una alteración de la función nuclear y del anclaje

citoplasmático al mismo. Dado que el mecanismo de acción y la distribución de la lamina es tan amplia, no es de extrañar que se hayan descrito fenotipos de CMT axonal, pero también de miopatía tipo Emery Dreifuss, cardiomiopatía, lipodistrofia, etc. (83).

6. Otros:

Por último, existe una serie de variantes de CMT en las que el mecanismo biológico subyacente no se puede clasificar en los anteriores epígrafes, bien por ser distinto o desconocido en este momento.

El gen *EGR2* codifica para un factor transcripcional con una función sobre la mielinización, vía la regulación de otros genes importantes en la mielinización como *MPZ*. Por ello, las mutaciones dominantes en dicho gen pueden provocar CMT1D (84, 85). Aparte, se ha descrito una única mutación causal en el gen *MED25*, correspondiente con un complejo coactivador transcripcional con una función patógena poco dilucidada (86). Es la mutación responsable del CMT2B2 y se hereda de forma AR. Las mutaciones en el gen *TRPV4*, que codifica para una proteína que conforma un canal catiónico no selectivo, causan CMT2C. Este canal se encuentra en una concentración bastante reducida en las neuronas, pero se postula que los canales mutantes alteran el flujo de calcio a través de la membrana axónica, causando así una degeneración axonal (87). También se han descrito mutaciones en el gen *PRPS1*, que pueden causar CMTX5, así como otra serie de fenotipos como sordera neurosensorial, síndrome de Arts, diabetes insípida, retinopatía, etc. (88). Dicho gen codifica para la fosforibosil-pirofosfato sintetasa 1, una enzima que cataliza el primer paso de la síntesis nucleotídica y del metabolismo de las purinas.

Las mutaciones en los genes *NDGRI* y *HK1* causan CMT4D y CMT4G (89, 90). Son dos subtipos de CMT desmielinizante de herencia recesiva que aparecen en pacientes de etnia

gitana y se conocen como neuropatía tipo Lom y Russe, respectivamente. El mecanismo biológico de ambas neuropatías es desconocido, si bien se ha demostrado que la proteína NDGR1 se expresa de manera preferente en las células de Schwann afectando la mielinización temprana (91).

En los últimos años se han descrito mutaciones causales en varios genes que no se conocían previamente y cuya patogenia no está del todo aclarada. Por ejemplo, las mutaciones dominantes en el gen *INF2* provocan CMT-DIE en el que se combina neuropatía y glomerulopatía. Dicho gen codifica para la formina-2, que actúa sobre la actina citoesquelética de la célula de Schwann e interacciona con la Rho-GTPasa Cdc42 y MAL, que intervienen en la mielinización (92, 93). Otro ejemplo son las mutaciones en el gen *PDK3*, que se han relacionado recientemente con el desarrollo de CMTX6 (94). Dicho gen codifica para la piruvato deshidrogenasa kinasa isoenzima 3, que ejerce su función en el ciclo bioenergético de la glicolisis, catalizando la descarboxilación de piruvato en acetil CoA. Lo que no se conoce con exactitud es como esa alteración bioenergética afecta de manera casi exclusiva al axón nervioso.

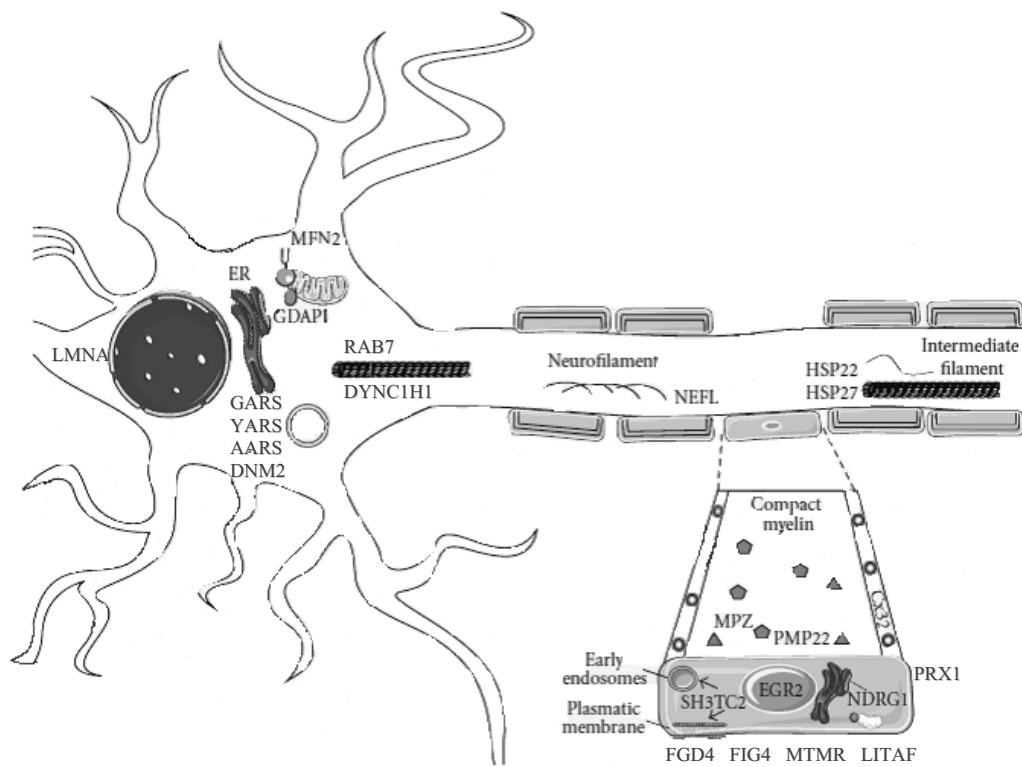


Figura 5: Esquema de las proteínas patógenas implicadas en CMT y la diversidad de funciones. Para esa figura se ha utilizado Servier Medical Art.

iii. Características clínicas; correlación genotipo-fenotipo:

La mirada de características clínicas que componen el fenotipo de CMT debe abordarse siempre teniendo en cuenta el genotipo subyacente. Desde que se descubrió el defecto genético causante del CMT1A, los estudios de correlación genotipo-fenotipo se han

sucedido y actualizado sin cesar. Asimismo se ha ido revisando la frecuencia relativa de las distintas mutaciones en las sucesivas series clínicas.

En estos momentos se conocen las frecuencias de mutaciones en los distintos genes causales en grandes series clínicas anglosajonas (95, 96), pero falta por comprobar si resultan extrapolables a otras poblaciones. La dificultad radica en establecer comparaciones directas entre series clínicas con distinta metodología y distinto número de genes estudiados (ver tabla 6).

En cualquier caso, siguiendo aproximadamente el orden de frecuencia relativa, vamos a analizar las características fenotípicas más relevantes de los distintos genes causales.

Gen	Saporta <i>et al.</i> (95)	Murphy <i>et al.</i> (96)	Gess <i>et al.</i> (97)	Benedetti <i>et al.</i> (98)	Østern <i>et al.</i> (99)
<i>PMP 22</i> (dup)	290	168	180	14	26
<i>GJB1</i>	80	46	47	6	20
<i>MPZ</i>	45	13	21	8	11
<i>MFN2</i>	21	12	12	4	13
<i>PMP22</i> (p. mut)	5	6	4		
<i>GDAP1</i>	6	2		2	
<i>NEFL</i>	4	2		1	2
<i>SH3TC2</i>	3	5			
<i>HSPB1</i>		2		2	
<i>TRPV4</i>		3			
<i>GARS1</i>	3		2		
<i>PRX1</i>	1				
<i>LITAF</i>	5	4			
<i>MTMR2</i>		1			
<i>GAN1</i>		1			
<i>BSCL2</i>		1			
<i>FIG4</i>	2				
<i>FGD4</i>			2		
<i>EGR2</i>				1	
<i>NDRG1</i>			2		
Pacientes CMT	739	425	506	94	435

Tabla 6: Distribución mutacional en series clínicas representativas.

1. *PMP 22* (duplicación): CMT1A.

Es la forma más frecuente de CMT en todas las series publicadas, afectando al 37-40% de los pacientes con CMT, y supone cerca del 70% de las formas desmielinizantes (95, 96). Las características fenotípicas son bastante constantes pero existe una sustancial variabilidad intra e interfamiliar con respecto a la gravedad de los síntomas. La edad de inicio suele ser en las primeras 2 décadas, si bien hay casos de inicio neonatal y otros en la edad adulta (19). El cuadro clínico habitualmente comienza con dificultad para correr o caminar por debilidad en la musculatura distal de miembros inferiores (MMII), o con la detección de una deformidad en los pies (pies cavos, dedos en martillo). A lo largo de las siguientes décadas la debilidad muscular y la atrofia van ascendiendo en los MMII y posteriormente aparecen también en miembros superiores (MMSS) (100, 101). La pérdida de sensibilidad puede afectar a todas las modalidades, especialmente la algésica y vibratoria, y tiene un patrón en guante y calcetín. Los síntomas sensitivos positivos y, fundamentalmente, el dolor son más frecuentes de lo que se pensaba inicialmente (102). Habitualmente en la exploración se demuestra debilidad y atrofia de la musculatura del pie y distal de la pantorrilla, provocando la típica imagen de 'piernas de cigüeña' o 'de botella de champán invertida' (figura 6). Los pies cavos son una de las manifestaciones cardinales de la enfermedad, aparecen en el 40-90% de los casos y son más evidentes a medida que avanza la enfermedad. Su desarrollo probablemente esté relacionado con la denervación y consecuente debilidad de la musculatura intrínseca del pie, principalmente de los músculos lumbricales, provocando una redistribución de las cargas mecánicas del antepie (103). Aparte de los pies cavos hay otra serie de deformidades óseas que pueden aparecer, aunque con menor frecuencia: dedos en martillo, retracción aquilea, manos en garra, escoliosis, etc. (19).



Figura 6: Atrofia de la musculatura distal de pantorrillas, ocasionando un aspecto de piernas de cigüeña, pies cavos y dedos en martillo en un paciente afecto de CMT1A.

Entre las manifestaciones menos frecuentes del CMT1A destaca la hipertrofia de nervios, que puede ser evidente clínicamente o sólo mediante estudios de imagen o anatomopatológicos (104). Recientemente se ha observado que algo menos del 40% de los pacientes también presenta alteración del sueño de tipo apnea obstructiva del sueño o síndrome de piernas inquietas (105). Asimismo pueden padecer hipoacusia neurosensorial escasamente progresiva o alteración de la comprensión en ambientes ruidosos (106, 107). Los estudios de conducción nerviosa muestran un enlentecimiento homogéneo de las velocidades de conducción en todos los nervios explorados. Dichos hallazgos pueden objetivarse desde la infancia y, a medida que avanza la enfermedad, las VC permanecen bastante constantes mientras que las amplitudes motoras van disminuyendo por el daño axonal secundario a la desmielinización mantenida (108). La VC motora en estos

pacientes es bastante homogénea, de hecho, recientemente se demostró que el 89% de los pacientes con CMT, fenotipo compatible y VC motora en MMSS entre 15 y 35 m/s tenían un subtipo CMT1A (95).

Los hallazgos anatomopatológicos en las biopsias de nervio sural en estos pacientes muestran un descenso en la densidad de fibras mielinizadas, con adelgazamiento de la mielina y frecuentes cambios hipertróficos. El hallazgo más característico es la aparición de bulbos de cebolla, que corresponden a proliferaciones concéntricas de células de Schwann que se organizan en torno a un axón. Estos fenómenos de desmielinización y remielinización anómala predominan en las fases iniciales de la enfermedad, mientras que en pacientes con mayor tiempo de evolución de la enfermedad y un fenotipo más grave, predomina la pérdida de fibras nerviosas y degeneración axonal (100) (figura 7).

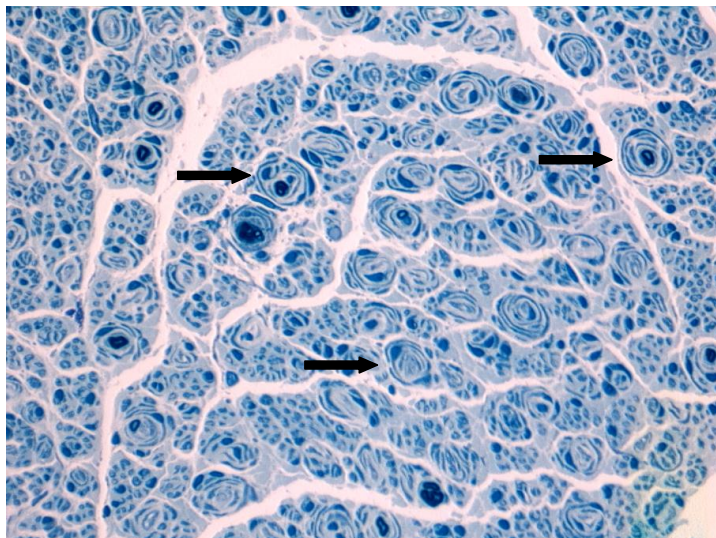


Figura 7: Anatomía patológica de nervio sural de un paciente con CMT1A, destacando la presencia de abundantes bulbos de cebolla (flechas) rodeando a fibras con diverso grado de mielinización.

La progresión de la enfermedad es lenta y existe bastante variabilidad entre las distintas series publicadas. La demostración objetiva de dicha progresión puede ser bastante difícil y se han utilizado distintas herramientas para ello. La más extendida es la escala CMT Neuropathy Score (CMTNS) y su segunda versión (CMTNS2) (109, 110), que agrupan una serie de parámetros clínicos y neurofisiológicos. El empeoramiento de la CMTNS en los pacientes con CMT1A es aproximadamente de 0,25-0,7 puntos por año (111, 112, 113), aunque en determinadas series se ha visto estabilidad o incluso leve mejoría de la escala en un periodo de un año (114). Aparte de dicha escala hay otra serie de herramientas clínicas que pueden ser útiles para objetivar la progresión, incluyendo la escala funcional de discapacidad, dinamometría, el 9-hole peg test, el test de Lunge, etc., así como ciertos parámetros neurofisiológicos o, incluso, en imágenes de resonancia magnética (RM) muscular de miembros inferiores (17, 111-115). En cualquier caso cabe destacar que existe una importante variabilidad tanto intra como interfamiliar e incluso en un mismo paciente puede existir un curso clínico prácticamente quiescente que en un momento determinado se acelera por razones desconocidas (116).

El conocimiento sobre la progresión clínica de esta enfermedad y la manera en la que puede ser objetivable es esencial para poder diseñar con fiabilidad ensayos clínicos terapéuticos. De momento no existen fármacos conocidos que modifiquen la historia natural de la enfermedad, aunque ya se han realizado varios ensayos clínicos aleatorizados y doble ciego con distintas dosis de ácido ascórbico, pero no alcanzaron los objetivos establecidos (113, 114). A nivel experimental existe una serie de compuestos que reducen la expresión del gen *PMP22* y alguno de ellos ya han sido probados en ratones, como la onapristona (antagonista del receptor de la progesterona) o la neurotrofina 3 (117, 118). Aunque no existan fármacos que modifiquen el curso de la

enfermedad, no debemos obviar en estos pacientes el tratamiento de soporte y sintomático. El enfoque terapéutico de estos pacientes debe ser multidisciplinar e incluir expertos en rehabilitación, fisioterapia, cirujanos ortopédicos, terapeutas ocupacionales y psicólogos. El ejercicio físico y la rehabilitación motora son beneficiosos, aunque los programas de ejercicio específicos deben ser comprobados aún mediante ensayos aleatorizados (119, 120). Las ortesis pueden ser útiles para contrarrestar la debilidad distal en tobillos y, en menor medida, en muñecas, mejorando la capacidad funcional de los pacientes (121, 122). La corrección quirúrgica de las deformidades esqueléticas también es una opción, especialmente de los pies cavos y los dedos en martillo, aunque debe ser indicada de forma individualizada y realizada por un equipo experto (123). Por último, no debemos olvidar la adaptación del medio del paciente a la enfermedad, y el apoyo para desarrollar las armas psicológicas necesarias para poder confrontarla (124).

2. *GJB1*: CMTX1.

Las mutaciones en el gen *GJB1* son la segunda causa más frecuente de CMT en todas las series. Las características clínicas y especialmente la gravedad del fenotipo varían según el sexo, siendo más homogéneo y grave en varones. En ellos la clínica suele aparecer antes de la segunda década, principalmente con torpeza para caminar, debilidad y atrofia de la musculatura distal de miembros inferiores (42, 125). En pocos años la debilidad y la atrofia también aparecen en la musculatura de las manos, característicamente en los músculos inervados por el nervio mediano y en la mano dominante (126) (figura 8). El cuadro se acompaña de hipoestesia distal en extremidades y habitualmente de arreflexia. El cuadro puede ser indistinguible de un paciente con CMT1A, si bien hay una serie de características clínicas que son más frecuentes en los pacientes con CMTX1: la atrofia

muscular (principalmente de la musculatura tenar), los síntomas positivos sensitivos y la hipoestesia (127).

En las mujeres el fenotipo tiene unas características bastante similares, pero existe una gran variabilidad en cuanto a la gravedad. Aproximadamente dos tercios de las mujeres tienen un fenotipo leve que no se modifica casi con la edad, e incluso existiendo un pequeño porcentaje completamente asintomáticas. El otro tercio de mujeres, en cambio, tienen manifestaciones clínicas superponibles a las de los varones, con un fenotipo más grave y progresivo (128). Se ha postulado que esta variabilidad se debe, en parte, a la inactivación aleatoria de uno de los cromosomas X que se produce en la embriogénesis, si bien esto no se ha podido demostrar fehacientemente (129).



Figura 8: Atrofia de predominio en la eminencia tenar en un paciente varón con CMTX1.

Un porcentaje importante de pacientes con CMTX1 desarrollan síntomas o signos compatibles con afectación de la mielina del SNC. Estos pueden ser simplemente un enlentecimiento de las latencias de los potenciales evocados troncoencefálicos, un mantenimiento de los reflejos osteotendinosos, o hiperreflexia (130). Asimismo se ha

descrito un pequeño número de pacientes en los que se desarrolla un cuadro agudo, tipo encefalopático, con lesiones en sustancia blanca evidentes en la RM cerebral, que se resuelve sin tratamiento alguno (131).

Los estudios de conducción nerviosa son bastante característicos, habitualmente los varones tienen velocidades de conducción motoras en el rango intermedio (30-40 m/s en el nervio mediano), mientras que las mujeres pueden tener velocidades algo más conservadas (30-50 m/s) (42, 125, 127). Aparte, existe una caída de amplitud proporcional a la gravedad del fenotipo. Estos hallazgos son menos uniformes que en los pacientes con CMT1A, existiendo diferencias entre distintos nervios del mismo paciente y mayor dispersión temporal (132, 133). En MMSS, parece existir una mayor afectación del nervio mediano que del nervio cubital, como también lo existe clínicamente (126).

A nivel anatomopatológico las biopsias de nervio sural de pacientes con CMTX1 son bastante homogéneas y muestran pérdida de fibras mielínicas, algún cluster regenerativo, adelgazamiento de las vainas de mielina y muy ocasionales estructuras tipo bulbo de cebolla, pero menos organizadas y frecuentes que en CMT1A (125, 132, 133).

3. *MPZ*: CMT1B, CMT4E, CMT2I/J, CMT-DID.

Las mutaciones en el gen *MPZ* pueden causar un amplio abanico de fenotipos. Habitualmente se distinguen dos grupos de pacientes, unos con una neuropatía desmielinizante grave de inicio muy precoz, y otros con una enfermedad de inicio en el adulto y curso más leve, con características neurofisiológicas axonales o intermedias (39). En el primer grupo de pacientes, el inicio sintomático puede ser desde el nacimiento (hipotonía neonatal) o aparecer a los pocos meses de vida, con un retraso en la adquisición de habilidades motoras. Se trata de neuropatías graves con debilidad importante, que puede desembocar en problemas para la respiración o deglución y pueden

incluso causar la muerte en la infancia (23). También hay pacientes en los que, aunque el inicio sea muy temprano, el curso es escasamente progresivo o, incluso, pueden mejorar discretamente con el tiempo. Electrofisiológicamente, estos pacientes se caracterizan por velocidades de conducción nerviosa muy enlentecidas ($VCMM < 15$ m/s), con amplitudes del potencial mantenidas. En la anatomía patológica habitualmente se puede observar una ausencia completa o disminución muy importante de la mielina de las fibras nerviosas, con preservación de los axones (figura 9). Se ha descrito alguna estructura tipo bulbo de cebolla atípica formada por láminas basales, así como fenómenos focales de desmielinización y remielinización (134). Gracias a los estudios de microscopía electrónica se ha visto que hay pacientes con zonas de mielina no compactada y otros en los que está anormalmente plegada formando tomáculas (135).

El grupo de pacientes con un inicio más tardío son mucho más numerosos y más heterogéneos, tanto clínicamente como mutacionalmente. Como conjunto, se trata de pacientes con un inicio en la edad adulta, apareciendo debilidad distal e hipoestesia en miembros inferiores que progresa lentamente sin causar gran discapacidad. En cualquier caso, hay ciertas mutaciones en los que la progresión puede ser más marcada, incluso llegando a una situación de imposibilidad para la deambulación autónoma (136). Existe una serie de manifestaciones clínicas asociadas a algunas mutaciones puntuales concretas, siendo la más frecuente las anormalidades pupilares, pero también se ha descrito hipoacusia neurosensorial o alteraciones de la sustancia blanca del SNC (136, 137). Los estudios neurofisiológicos también son variables según la mutación subyacente, la mayoría de familias tienen velocidades de conducción motora de >30 m/s en miembros superiores, estando claramente en rango axonal en algunos pacientes (138). En cualquier caso, en la mayoría de los estudios se evidencia una caída de la amplitud de los potenciales motores y sensitivos, en concordancia con la degeneración axonal subyacente.

Dichos hallazgos suelen ser homogéneos en los distintos nervios, si bien se han descrito casos con bloqueos de conducción (139). Las imágenes anatomopatológicas de este grupo de pacientes son claramente distintas de las del grupo de pacientes con un inicio precoz. En ellas predomina la degeneración y regeneración axonal, aunque también aparece una disminución en el número de fibras mielínicas y, ocasionalmente, signos de desmielinización. Los fenómenos de descompactación de la mielina o la aparición de tomáculas son muy poco frecuentes (135, 136, 138).

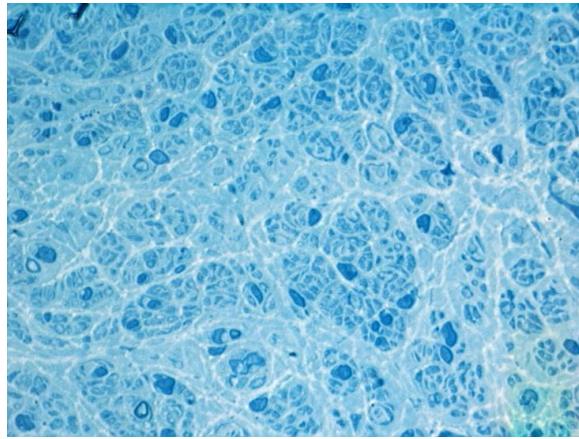


Figura 9: Corte semifino de un paciente con un neuropatía hipomielinizante congénita por mutación en *MPZ*, con una ausencia casi completa de fibras mielinizadas.

4. *MFN2*: CMT2A2.

Las mutaciones en el gen *MFN2* son la causa más frecuente de CMT axonal en la mayoría de series publicadas. Provocan un cuadro polineuropático con una variabilidad bastante amplia en cuanto a la gravedad. El grupo más numeroso de pacientes son aquellos que padecen un fenotipo grave, con una edad de inicio temprana (primeros 10 años), retraso

en el desarrollo motor, debilidad distal, caídas, etc. La progresión de la debilidad e hipoestesia es muy rápida, apareciendo debilidad proximal en pocos años, y necesitando una silla de ruedas antes de los 20 años en la mayoría de los casos (140, 141). Todos presentan deformidades óseas distales (dedos en martillo, pies cavos...) y en algún paciente se ha descrito escoliosis, pérdida de visión por una neuropatía óptica, parálisis de cuerdas vocales o hipoacusia neurosensorial (142). Puede ser una característica de estos pacientes la asimetría entre las distintas extremidades, y la afectación precoz de musculatura proximal. El resto de pacientes tienen un inicio algo más tardío y oscilan entre pacientes con un fenotipo moderado, y otros con un inicio mucho más tardío (hasta los 50 años) y un fenotipo más leve. A este grupo de pacientes es a los que se les llama un fenotipo CMT2 'clásico', que se caracteriza por un inicio en la edad adulta con debilidad e hipoestesia distal de miembros inferiores, que van ascendiendo por las piernas y apareciendo en las manos tras años de evolución, sin llegar a causar una discapacidad importante (143). Estos pacientes más leves desarrollan mucho menos frecuentemente neuropatía óptica o parálisis de cuerdas vocales.

Neurofisiológicamente, estos pacientes tienen una polineuropatía claramente axonal, con velocidades de conducción mantenidas y amplitudes de potenciales motores y sensitivos que van cayendo conforme progresa la enfermedad. En casos graves es muy frecuente que la caída de la amplitud sea tal que el potencial no se pueda registrar en las zonas más distales (141). Se han descrito RM cerebrales con hiperintensidades de sustancia blanca, habitualmente sin ningún signo clínico de afectación del SNC y recientemente atrofia de la médula espinal en un pequeño número de casos (142). Los hallazgos anatomopatológicos son compatibles con una degeneración axonal primaria, siendo evidente la caída en el número de fibras mielínicas proporcional a la gravedad del cuadro, así como signos de degeneración y regeneración axonal. Con microscopía electrónica se

ha podido confirmar la degeneración axonal y las anormalidades de las mitocondrias axonales, que aparecen redondeadas y anormalmente agregadas (144, 145).

5. *GDAP1*: CMT4A, CMT2H, CMT2K.

Las mutaciones en el gen *GDAP1* suelen ser una causa menos frecuente de CMT que las anteriores, aunque hay series en las que explica hasta el 14% de los pacientes con CMT axonal (146). El fenotipo en estos pacientes está claramente diferenciado según el modo de herencia de la mutación causal.

Las mutaciones con herencia AR provocan un fenotipo muy grave, con un inicio precoz. Cerca de la mitad de los pacientes desarrollan hipotonía neonatal y el resto suele tener síntomas en el primer año de vida. La debilidad e hipoestesia es predominantemente distal inicialmente, pero en pocos años afecta a musculatura proximal, siempre en mayor medida en miembros inferiores. Con los años, la polineuropatía acaba ocasionando una discapacidad muy importante, necesitando silla de ruedas para desplazarse antes de los 20 años. Aparte de las deformidades óseas distales, un pequeño porcentaje puede asociar escoliosis y la gran mayoría acaban desarrollando parálisis de cuerdas vocales y diafragmática (147). Pese a que los hallazgos neurofisiológicos de estos pacientes han sido interpretados como desmielinizantes, axonales o intermedios, las características de los mismos son bastante homogéneas (15, 55, 148). Tanto las latencias como las velocidades de conducción nerviosa registradas sobre musculatura no atrófica suelen estar conservadas (> 40 m/s). Aparte, se observa una disminución precoz de las amplitudes motoras en la musculatura distal en concordancia con la debilidad y atrofia tan manifiesta, y una menor disminución de la amplitud sensitiva (147). A nivel histológico existe una disminución de las fibras mielínicas, con agrupamientos de axones amielínicos (clusters regenerativos) y escasas formaciones tipo bulbo de cebolla rodeando habitualmente a

clusters regenerativos. Con microscopio electrónico se detecta una mielina con plegamientos anómalos y alguna tomácula aislada (149).



Figura 10: Paciente con mutaciones AR en *GDAP1* con debilidad proximal y distal que asocia parálisis de cuerdas vocales con atrofia de las mismas.

Cuando la mutación causal se hereda de forma AD, las características clínicas son muy distintas apareciendo un fenotipo leve con inicio en adolescencia o en la edad adulta. Estos pacientes suelen debutar con tropiezos, o debilidad distal en miembros inferiores, desarrollando un fenotipo CMT2 ‘clásico’ lentamente progresivo. A pesar de que en la mayoría de pacientes la progresión es lenta y no es muy incapacitante, se han descrito algunos pacientes con una progresión rápida pese a debutar en la edad adulta (16, 150). Neurofisiológicamente existe una caída de amplitudes motoras y sensitivas con velocidades de conducción claramente preservadas. Los estudios histológicos en estos pacientes son escasos y se describe una pérdida de fibras mielínicas mucho menor que en

pacientes con herencia AR, con prominente degeneración y regeneración axonal y alguna estructura mielínica tipo bulbo de cebolla atípico. En la microscopía electrónica se evidencia la prominente degeneración axonal, así como una agregación anómala de mitocondrias (150).

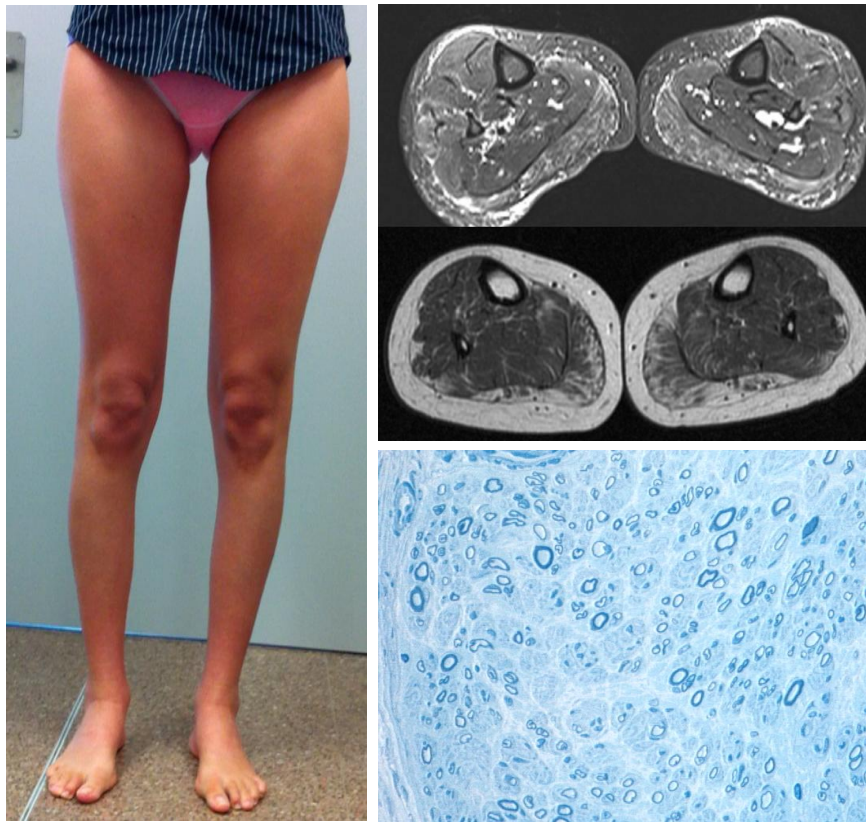


Figura 11: Mujer joven con un fenotipo leve ocasionado por una mutación AD en *GDAP1*. Infiltración grasa y leve edema muscular en musculatura del grupo posterior de las pantorrillas. Corte semifino a pequeños aumentos del nervio sural observando una pérdida de fibras mielínicas con leves anomalías en la mielina.

6. *PMP22* (mutaciones puntuales): CMT1E.

Las mutaciones puntuales en el gen *PMP22* pueden causar un fenotipo variable, que oscila entre pacientes con un cuadro desmielinizante grave y otros con clínica de neuropatía hereditaria con predisposición a las parálisis por compresión. Solamente el primer grupo se considera CMT1E como tal, aunque hay ocasiones en el que el fenotipo puede estar entremezclado (151). Es una causa poco frecuente de CMT (<1%) y generalmente son pacientes con un inicio sintomático muy precoz (en la primera década), incluso con retraso en la adquisición de habilidades motoras, y una progresión rápida hasta acumular una gran discapacidad (37). En estos pacientes se han descrito deformidades óseas tanto proximales (escoliosis) como distales, así como otras características menos frecuentes como sordera (152). A nivel neurofisiológico existe una reducción muy llamativa en las velocidades de conducción con VCMM inferiores a 10m/s y latencias distales muy prolongadas (37). La anatomía patológica del nervio sural tiene características similares al CMT1A, con pérdida de fibras mielinizadas proporcional a la gravedad y abundantes bulbos de cebolla (153). En los casos en los que el fenotipo está entremezclado con una neuropatía hereditaria con predisposición a las parálisis por compresión, también se pueden observar tomáculas.

En unos pocos pacientes el fenotipo es más leve, con una progresión parecida al CMT1A. De manera excepcional se ha descrito una familia con una polineuropatía muy leve de inicio en el adulto, progresión lenta y hallazgos neurofisiológicos y anatomopatológicos concordantes con una neuropatía axonal (154).

7. *NEFL*: CMT1F, CMT2E.

Las mutaciones en el gen *NEFL* son una causa poco frecuente de CMT con una variabilidad tanto fenotípica como genotípica muy importante. La edad de inicio suele ser en las dos primeras décadas, pero existe una variabilidad muy manifiesta entre pacientes con distintas mutaciones e incluso entre pacientes con un mismo genotipo (45, 155). Inicialmente aparece torpeza y debilidad distal en miembros inferiores que progresa rápidamente en la mayoría de casos, con debilidad proximal y necesidad de silla de ruedas. La hipoestesia también es bastante prominente y afecta todas las modalidades con un gradiente distal>proximal (156). Un pequeño porcentaje de pacientes presentan además síntomas de afectación del SNC, principalmente ataxia cerebelosa, aunque también se han descrito hipoacusia o enlentecimiento de potenciales visuales (156, 157, 44). Los estudios neurofisiológicos también muestran una importante variabilidad, con velocidades de conducción que pueden estar enlentecidas o ser normales, y amplitudes disminuidas de manera proporcional a la gravedad. Por este motivo no es de extrañar que estos pacientes hayan sido clasificados como CMT1, CMT2, o CMT intermedia (44, 45). En las biopsias de nervio sural generalmente predominan los hallazgos de degeneración axonal pero también son frecuentes las alteraciones de la mielina. Asimismo se ha descrito pérdida de fibras mielínicas, fibras con mielina delgada, degeneración axonal con clusters regenerativos, estructuras tipo bulbo de cebolla y, en algún caso, axones gigantes (44, 99, 158). En los estudios de microscopía electrónica se puede detectar las anomalías de los neurofilamentos propios, con acúmulos de los mismos y degeneración axonal secundaria (159).

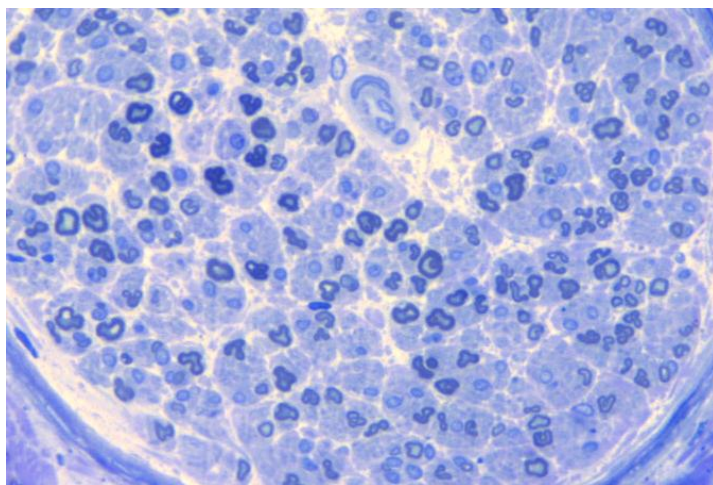


Figura 12: Corte semifino a pequeños aumentos observando una pérdida de fibras mielínicas y adelgazamiento de la misma.

8. *LITAF*: CMT1C.

Las mutaciones en el gen *LITAF* son una causa poco frecuente de CMT. Habitualmente el fenotipo es difícilmente distinguible del de los pacientes con CMT1A. Presentan una edad de inicio variable, generalmente en las primeras dos décadas, debutando con pies cavos, torpeza y/o tropiezos al caminar. Esto se sigue de una debilidad e hipoestesia distal lentamente progresiva que no suele condicionar una discapacidad muy importante (160, 161). Ocasionalmente se ha observado hipertrofia de nervio retroauricular o hipoacusia neurosensorial (162). Neurofisiológicamente todos los pacientes presentan velocidades de conducción nerviosa enlentecidas en rango desmielinizante, con retraso en latencias distales, salvo una única familia con hallazgos consistentes con un subtipo axonal (VCMM conservada y descenso de amplitudes) (162). No es raro encontrar bloqueos de conducción nerviosa en estos pacientes o incluso dispersión temporal lo cual es poco habitual en CMT1A (163, 164, 165). A nivel anatomopatológico los hallazgos son muy

similares a CMT1A, con pérdida de fibras mielínicas y abundantes bulbos de cebolla, salvo en la familia con un fenotipo axonal en el que la histología es concordante con el mismo (162, 165).

9. *EGR2*: CMT1D, CMT4E.

Las mutaciones en el gen *EGR2* son una causa muy poco frecuente de CMT desmielinizante y pueden heredarse de manera AR o AD. Pese a que se han descrito apenas 14 mutaciones patogénicas el espectro fenotípico es amplio (84). Un grupo importante de estos pacientes presentan un fenotipo grave con inicio muy precoz, retraso en la adquisición de hitos motores, debilidad distal y proximal progresiva importante. Estos pacientes frecuentemente asocian afectación de nervios craneales, fundamentalmente debilidad facial aunque también anomalías pupilares, de los movimientos oculares o hipoacusia (166, 167). En un pequeño porcentaje la debilidad llega a afectar al diafragma ocasionando insuficiencia respiratoria e incluso la muerte a una edad temprana (168). En el otro extremo se han descrito un grupo de pacientes con una edad de inicio más tardía (hasta 59 años) y un fenotipo similar al CMT1A, con debilidad e hipoestesia distal lentamente progresivas, pies cavos, etc. (84, 169). Neurofisiológicamente los hallazgos también son variables y concordantes con la gravedad del fenotipo. Las velocidades de conducción motora en los pacientes con fenotipo precoz y grave suelen estar muy disminuidas (< 10 m/s), mientras que en los pacientes con inicio más tardío y fenotipo más leve suelen estar menos disminuidas (15-40 m/s), pero siempre acorde a un CMT desmielinizante o intermedio (84, 167). Histológicamente, en los pacientes con un fenotipo grave, se puede observar una ausencia completa de mielina en todas las fibras (neuropatía hipomielinizante congénita) o una disminución importante de la misma, con abundantes bulbos de cebolla (fenotipo

Dejerine-Sottas) (84, 168). Los pacientes con un fenotipo más leve pueden tener biopsias indistinguibles de pacientes con CMT1A (169).

10. *SH3TC2*: CMT4C.

Las mutaciones en *SH3TC2* son probablemente la causa más frecuente de CMT4. Es una causa muy frecuente de CMT en la población de etnia gitana, pero también se han descrito pacientes de otras etnias (170). El fenotipo es indistinguible entre pacientes de distintas etnias y genotipos. El comienzo sintomático suele ser en la infancia pero la gravedad y progresión posterior es bastante variable.

Inicialmente los pacientes refieren tropiezos, inestabilidad y deformidades óseas tanto distales (pies cavos), como proximales (escoliosis). La aparición de escoliosis es característicamente precoz en estos pacientes y mucho más frecuente que en otros tipos de CMT (171). La debilidad suele ser inicialmente distal, pero en cerca de la mitad de los pacientes puede existir una cierta debilidad proximal desde el principio (172). Asimismo la hipoestesia es prominente e incluye todos los tipos de sensibilidad, causando inestabilidad y ataxia sensitiva. Frecuentemente existe afectación de nervios craneales con hipoacusia, neuropatía vestibular, debilidad facial, atrofia lingual, o problemas para la deglución (172, 173, 174). Pese a que el inicio es precoz, habitualmente la progresión es muy lenta, aunque hay casos en los que se desarrolla una gran discapacidad funcional. Neurofisiológicamente las velocidades de conducción motora están en rango desmielinizante o intermedio y existe una mayor disminución de las amplitudes del potencial nervioso sensitivo que motor (174). Puede existir asimetría entre los distintos nervios explorados, así como dispersión temporal o bloqueos de conducción incompletos (172). Los hallazgos anatomopatológicos habitualmente son específicos e incluyen una pérdida de fibras mielínicas acompañada de estructuras similares a los bulbos de cebolla

compuestos por láminas de membrana basal y células de Schwann con procesos anormalmente largos y atenuados (173, 175). En una familia aislada también se ha descrito la presencia de axones gigantes (171).

11. *NDRGI*: CMT4D.

Las mutaciones en *NDRGI* son una causa de CMT4 que sólo se ha descrito en enfermos de etnia gitana. Se conoce también como neuropatía tipo Lom por el pueblo balcánico en el que se descubrió la primera familia. Se trata de una neuropatía bastante grave, debutando en la primera década con tropiezos, inestabilidad y debilidad distal en miembros inferiores. Aparece también debilidad en manos antes de los 15 años y una inestabilidad manifiesta, por afectación de todas las modalidades sensitivas. De manera característica estos pacientes desarrollan hipoacusia neurosensorial antes de los 20 años que puede desembocar en sordera (176). Ocasionalmente asocian síntomas de debilidad en musculatura bulbar como disartria, disfagia o atrofia de la lengua (177, 178). Neurofisiológicamente los pacientes con este tipo de neuropatía presentan conducciones motoras enlentecidas tanto en nervios proximales como distales ($VCMM < 15$ m/s) y a medida que progresa la enfermedad pueden enlentecerse un poco más (179). Las conducciones sensitivas habitualmente están ausentes desde edades tempranas y existen signos de denervación distal muy importante en los estudios electromiográficos. A nivel anatomopatológico existe una depleción de fibras mielínicas con adelgazamiento de las vainas de mielina y estructuras tipo bulbo de cebolla de pequeño tamaño y mal definidos que tienden a desaparecer con la progresión de la enfermedad (176). Ocasionalmente se ha descrito descompactación de la mielina o inclusiones axónicas curvilíneas (180).

12. *HK1*: CMT4G.

Las mutaciones en el gen *HK1* son una causa poco frecuente de CMT4 que sólo ha sido descrita en pacientes de etnia gitana. El fenotipo es similar a la neuropatía tipo Lom, pero aparece con menor frecuencia la afectación de pares craneales. Los síntomas se inician en la primera década e incluyen tropiezos, inestabilidad y/o debilidad distal en miembros inferiores. Las deformidades óseas son frecuentes, tanto distales (pies cavos, dedos en martillo) como proximales (escoliosis en cerca del 50% de los pacientes) (181, 182). La debilidad afecta a miembros superiores de una manera más tardía y es infrecuente la aparición de sordera u otros síntomas de afectación de pares craneales. La alteración sensitiva incluye todas las modalidades, causando inestabilidad y ataxia sensitiva. La progresión en la enfermedad suele ser bastante lenta pero el espectro de discapacidad es bastante amplio. Los hallazgos neurofisiológicos son bastante homogéneos e incluyen unas conducciones motoras con enlentecimiento leve en rango desmielinizante o intermedio (VCMM 20-32 m/s) con caídas de amplitud proporcionales a la debilidad y atrofia (mayor distalmente y en miembros inferiores). Las conducciones sensitivas están más afectadas que las motoras, siendo inexcitables en la gran mayoría de los pacientes (182). Histológicamente los hallazgos son poco específicos e incluyen pérdida de fibras mielínicas, adelgazamiento de las vainas de mielina y signos de regeneración mielínica (181).

13. *PRXI*: CMT4F.

Las mutaciones en el gen *PRXI* son una causa poco frecuente de CMT4 que aparece primordialmente en el sudeste asiático. Las mismas causan una neuropatía grave con un inicio precoz en la gran mayoría de los casos, aunque se han descrito pacientes aislados con inicio en la edad adulta (183, 184). Más de la mitad de los pacientes debutan con un

retraso en la adquisición de hitos motores, apareciendo un trastorno de la marcha con inestabilidad franca y debilidad distal. Posteriormente la progresión es bastante lenta, incluso casi quiescente en algunos pacientes (185). Clínicamente predomina la hipoestesia de todas las modalidades y la consecuente inestabilidad por ataxia sensitiva. La debilidad habitualmente permanece circunscrita a la musculatura distal (miembros inferiores > superiores) y son muy frecuentes las deformidades óseas distales y la escoliosis (81). Los estudios de conducción nerviosa también son congruentes con el predominio sensitivo, apareciendo una ausencia de potenciales sensitivos en la mayoría de pacientes. Las conducciones motoras están muy enlentecidas (VCMM <20 m/s), con retraso en las latencias distales y signos de una pérdida distal axonal precoz (81). Histológicamente aparece una pérdida de fibras mielínicas con adelgazamiento de la misma, así como bulbos de cebolla típicos en todos los pacientes. En ocasiones se observan bulbos de cebolla compuestos por membrana basal, plegamientos anómalos de mielina, tomáculas, o anomalías en la mielina del paranodo (81, 183).

14. *FGD4*: CMT4H.

Las mutaciones en el gen *FGD4* son una causa rara de CMT4 descrita inicialmente en familias consanguíneas de África oriental. Estas familias padecían una neuropatía de inicio en los primeros dos años, con retraso en el desarrollo psicomotor y una progresión lenta pero que condicionaba una gran discapacidad (186). Posteriormente el fenotipo se ha ido ampliando, de manera que se conocen pacientes con un inicio algo más tardío y que permanecen ambulantes (187). En cualquier caso, parece que en todos los casos existe un predominio de la hipoestesia y la ataxia sensitiva sobre la debilidad, que suele ser distal y de miembros inferiores. Frecuentemente aparecen escoliosis y deformidades en los pies pero la afectación de pares craneales es muy rara. Los hallazgos

neurofisiológicos son bastante homogéneos e incluyen una ausencia de potenciales sensitivos registrables y conducciones motoras con una velocidad de conducción muy reducida (VCMM < 12 m/s), latencias prolongadas y frecuente disminución de amplitud (186, 187). Histológicamente hay una pérdida de fibras mielínicas, con adelgazamiento de la mielina de las fibras restantes. Se encuentran ocasionales bulbos de cebolla, pero el hallazgo más característico son los pliegues anómalos y protrusiones de las vainas de mielina de las pocas fibras mielinizadas (186, 188).

15. *FIG4*: CMT4J.

Las mutaciones en *FIG4* pueden causar CMT4 con un fenotipo bastante característico. La edad de inicio es muy variable, desde la infancia tardía hasta la sexta década y habitualmente refirieren problemas para caminar o atrofia muscular. La progresión de la debilidad es muy diversa, pero de manera característica es asimétrica y afecta muy precozmente a la musculatura proximal (189). De hecho, es frecuente que estos pacientes desarrollen de una manera subaguda (en unos meses) una debilidad en una extremidad hasta quedar prácticamente inmóvil, pudiendo confundirse con una neuropatía adquirida o una enfermedad de motoneurona (190). En cualquier caso, en todos los pacientes la debilidad y la atrofia muscular predominan claramente sobre los síntomas sensitivos, que son escasos y de predominio distal. Rara vez se ha descrito afectación de pares craneales del tipo de atrofia lingual o debilidad en la motilidad ocular (191). La progresión de la enfermedad es variable incluso en un mismo paciente, pudiendo desembocar en una parálisis casi completa de la musculatura o en una discapacidad mucho más leve. Los estudios neurofisiológicos revelan unas conducciones nerviosas sensitivas levemente más preservadas que las motoras. En estas últimas existe una caída importante de la amplitud, con velocidades de conducción disminuidas (VCMM 20-40 m/s, con amplitudes > 1 mV)

y latencias distales prolongadas (191). Es muy característica la presencia de signos de denervación en musculatura proximal y distal mediante la electromiografía de fibra fina. Anatomopatológicamente existe una pérdida de fibras mielínicas, principalmente de gran tamaño, con adelgazamiento de la mielina y alguna estructura tipo bulbo de cebolla (189). Con microscopía electrónica se observan signos de degeneración mielínica (191).

16. *MTMR2/MTMR13/MTMR5*: CMT4B1, CMT4B2, CMT4B3.

Las mutaciones en distintos genes de la familia de las miotubularinas son una causa poco frecuente de CMT4. El fenotipo de las distintas formas tiene elementos en común pese a tener algún aspecto diferenciador.

Las mutaciones en el gen *MTMR2* fueron las primeras en descubrirse y de momento son el tipo más frecuente de los tres. Habitualmente se trata de una neuropatía grave, con un inicio en la infancia temprana, bien con retraso en la adquisición de hitos motores o a los pocos años de vida. La debilidad es inicialmente distal en miembros inferiores, pero progresa hasta musculatura proximal y de miembros superiores, necesitando una silla de ruedas para la deambulación en la 2^a-3^a década e incluso llegando a causar la muerte en alguna ocasión (63, 192). Las alteraciones sensitivas son mucho menos pronunciadas. En alguna ocasión existe afectación de musculatura facial, estridor, disfagia e insuficiencia respiratoria (193). Recientemente se ha descrito una paciente japonesa con un cuadro clínico más leve, inicio en la segunda década y debilidad exclusivamente distal de predominio en miembros inferiores (194). Neurofisiológicamente los pacientes presentan conducciones motoras enlentecidas (<20m/s en MMSS), con caída precoz de amplitudes y conducciones sensitivas que habitualmente no son registrables (194). Histológicamente existe una pérdida de fibras mielínicas y las fibras restantes están hipomielinizadas. Éstas presentan zonas de engrosamiento focal o plegamientos anómalos de la mielina, con

protrusiones de mielina redundante que improntan sobre el axón. Esto último es un hallazgo muy característico en estos pacientes, pese a que no es exclusivo de este genotipo (63, 194).

Las mutaciones en el gen *MTMR13/SBF2* se han descrito en familias de África nororiental, Italia y Japón (64, 65, 195, 196). Clínicamente el cuadro es similar al causado por mutaciones en *MTMR2*, con un inicio entre los 5-15 años con debilidad distal y una progresión a musculatura proximal marginalmente más lenta. Existe hipoestesia asociada, pero no predomina en el cuadro clínico. Las deformidades óseas son distales y no se ha descrito afectación de pares craneales salvo hipoacusia neurosensorial (196). En cambio lo que sí es característico de algunas familias es que asocian la aparición de glaucoma congénito (65, 195). Asimismo la familia japonesa descrita tiene un aumento de las proteínas en LCR (195). Neurofisiológicamente hay un enlentecimiento discreto de las velocidades de conducción motora (en torno a 20 m/s en nervio mediano) con caída de amplitud asociada y las conducciones sensitivas no son registrables. Histológicamente los hallazgos son muy similares al CMT4B1, siendo característico los plegamientos anómalos de mielina, con protrusiones de mielina redundante que improntan sobre el axón (64, 65, 195, 196).

Las mutaciones en el gen *MTMR5/SBF1* fueron descritas como causa de CMT4 en 2013 y de momento sólo se han encontrado en 2 familias en Korea y Arabia Saudi (66, 197). El fenotipo aún debe ser confirmado pero aparentemente es similar a los anteriores, con un inicio en las 2 primeras décadas y un cuadro progresivo con mayor afectación motora que sensitiva. Asocian deformidades óseas distales y en alguna ocasión escoliosis (66). No se ha descrito afectación de pares craneales ni glaucoma, pero la familia de Arabia presenta estrabismo, sindactilia y microcefalia aunque no está claro si son atribuibles a la misma enfermedad (197). Los estudios de conducción nerviosa revelan un enlentecimiento de

conducciones motoras menor que en las anteriores (30-40 m/s en MMSS) con descenso de amplitudes y denervación precoz. Las conducciones sensitivas no eran registrables (66). Los hallazgos anatomopatológicos son superponibles a los de CMT4B1 y CMT4B2, con la única diferencia notable siendo que la pérdida de fibras mielínicas parece algo menor (66).

17. *KIF1B*: CMT2A1.

Las mutaciones en el gen *KIF1B* se describieron en una única familia japonesa antes del descubrimiento de las mutaciones en *MFN2* y se denominaron CMT2A. Desde entonces no se ha vuelto a encontrar mutaciones en dicho gen pero la patogenicidad de en esta familia está bien argumentada, con modelo animal inclusive (51). Clínicamente estos pacientes desarrollan un fenotipo leve iniciando en la adolescencia con debilidad y/o deformidades óseas distales de miembros inferiores. La progresión es muy lenta, afectando posteriormente a musculatura de pantorrilla (tanto del compartimento anterolateral como posterior) pero causando una escasa discapacidad. Los hallazgos sensitivos son mínimos y no existe afectación de pares craneales, escoliosis u otras características clínicas diferenciadoras (198). Neurofisiológicamente existe una caída de amplitudes motoras y sensitivas de predominio en miembros inferiores con velocidades de conducción mantenidas salvo en nervios con una caída importante de amplitud. No existen datos anatomopatológicos.

18. *RAB7*: CMT2B.

Las mutaciones en *RAB7* son una causa poco frecuente de CMT2 con un fenotipo bastante diferenciado. Se trata de una neuropatía con claro predominio sensitivo, incluso existen familias que pueden encuadrarse dentro de una neuropatía hereditaria sensitiva y

autonómica (199). El inicio es antes de los 30 años, aunque las deformidades óseas distales en miembros inferiores pueden existir desde la infancia (200, 201). El primer síntoma suele ser la aparición de úlceras indoloras en pies, tropiezos o inestabilidad, provocados por una hipoestesia muy marcada de todas las modalidades sensitivas en miembros inferiores y, en menor medida, una debilidad de la musculatura distal de piernas. A medida que progresa la enfermedad se pueden afectar también la sensibilidad y fuerza de las manos pero siempre menos que en MMII y no suelen alcanzar una discapacidad importante. En cualquier caso, la manifestación clínica más relevante es la aparición de lesiones cutáneas en pies que pueden desembocar en infecciones cutáneas u osteomielitis que ocasionalmente se han de tratar mediante la amputación del tejido afecto (199, 200). Aparte, se ha descrito que estos pacientes pueden tener afectación del sistema nervioso autónomo (202). Los estudios de conducción nerviosa muestran unas amplitudes tanto sensitivas como motoras muy disminuidas distalmente en miembros inferiores, con velocidades de conducción mantenidas. Histológicamente aparecen signos de degeneración axonal de fibras finas y gruesas con clusters regenerativos y escasos signos de alteración mielínica secundaria como proliferación de células de Schwann o estructuras tipo bulbo de cebolla (200).

19. *LMNA*: CMT2B1.

Las mutaciones en el gen que codifica para lamina A/C pueden desembocar en un abanico fenotípico muy amplio, que incluye una neuropatía hereditaria axonal (CMT2B1). También se han descrito mutaciones en dicho gen que ocasionan distrofias (de cinturas, tipo Emery-Dreifuss, y congénita), cardiopatías (miocardiopatía dilatada, alteraciones de la conducción), lipodistrofias y síndromes de envejecimiento acelerado (83). La mutación que se describió inicialmente como causa de CMT2B1 se hereda de forma autosómico

recesiva y se ha descrito en familias del norte de África donde existe un efecto fundador (82). En dichos pacientes la edad de inicio es variable, pero habitualmente aparece en las 2 primeras décadas. Suelen debutar con debilidad distal en miembros inferiores, progresando a miembros superiores y a musculatura proximal de miembros inferiores en un tiempo variable. La escoliosis es frecuente, así como las deformidades óseas distales, y los déficits sensitivos son algo menos prominentes que los motores (82, 203, 204). Neurofisiológicamente los hallazgos corresponden con una variante axonal, las velocidades de conducción y latencias distales son normales y las amplitudes nerviosas sensitivas y motoras están disminuidas. La anatomía patológica muestra una pérdida de fibras nerviosas, sobre todo de gran diámetro. Es posible observar signos de degeneración axonal y clusters regenerativos sin anomalías mielínicas asociadas (203, 204).

Aparte de los pacientes con herencia recesiva y un fenotipo puramente neuropático, cada vez existen más casos de fenotipo combinado (83, 205, 206). De hecho, la presencia de una neuropatía axonal se ha encontrado en pacientes con distrofia muscular, cardiomiopatía, leuconiquia o una combinación de los mismos (207, 208). En estos casos, la variabilidad en la misma familia puede ser muy importante, incluso hay casos en los que cada miembro de la familia desarrolla un tipo de afectación. Generalmente la neuropatía en estos casos combinados es algo menos grave que la que aparece en los pacientes del norte de África.

20. *MED25*: CMT2B2.

La mutación Ala335Val en el gen *MED25* se ha descrito en homocigosis en una única familia de Costa Rica que padece CMT (86). Estos pacientes presentan una neuropatía axonal menos grave que otras formas axonales recesivas (*LMNA*, *GDAP1*, etc.). El debut suele ser en la edad adulta (media de 34 años) con debilidad distal en miembros inferiores

y una progresión lenta. Llega a afectar a la musculatura distal de miembros superiores en cerca de la mitad de los pacientes y asocian deformidades óseas distales pero no escoliosis ni afectación de pares craneales. Los hallazgos sensitivos son congruentes con los motores. Neurofisiológicamente existe un mantenimiento de las velocidades de conducción motoras (> 40 m/s en MMSS) con descenso de las amplitudes y habitualmente no se puede registrar las conducciones sensitivas en miembros inferiores. No existen datos histológicos de la familia descrita (209, 210).

21. *TRPV4*: CMT2C.

Las mutaciones en el gen *TRPV4* causan CMT2C, una neuropatía axonal con un fenotipo bastante característico, pero también se han descrito en pacientes con atrofia muscular espinal (congénita y escapuloperoneal), neuropatía hereditaria motora distal y displasias esqueléticas (87, 211, 212, 213). Los pacientes con CMT2C padecen una neuropatía con una variabilidad muy importante, pudiendo ser muy grave en algunos pacientes o asintomática en otros (214). Se caracteriza por un inicio precoz, aunque puede ser tardío y una frecuente afectación de las cuerdas vocales y, en menor medida, de la musculatura respiratoria. De hecho, cerca de la mitad de los pacientes debutan con estridor o ronquera, mientras que los otros lo hacen con debilidad distal en miembros inferiores. En todos los casos la neuropatía es de predominio motor, afectando a musculatura proximal a lo largo de la evolución de la misma. Las deformidades óseas proximales como escoliosis o incluso escápulas aladas son frecuentes. La parálisis de cuerdas vocales aparece de una manera precoz y puede acabar desembocando en una traqueostomía para poder respirar (87, 212). Aparte se han descrito afectación de otros pares craneales causando parálisis diafragmática, hipoacusia neurosensorial o alteración en la motilidad ocular, así como incontinencia urinaria. Ocasionalmente se ha asociado la neuropatía a una displasia

esquelética o simplemente a estatura baja (215). Los estudios de conducción nerviosa revelan una neuropatía axonal de predominio motor, con caída en las amplitudes motoras y velocidades de conducción bastante preservadas. La histología es poco específica y se encuentra una pérdida de fibras mielínicas con ocasionales axones en proceso de degeneración (87).

22. *GARS*: CMT2D.

Las mutaciones en el gen *GARS* causan una neuropatía de predominio motor que puede ser clasificada como CMT2D o neuropatía hereditaria motora distal o atrofia muscular espinal distal, según si existe o no un componente sensitivo (24, 216). En cualquier caso, el fenotipo es común e incluso en determinadas familias existen pacientes diagnosticados con CMT2D y otros como neuropatía hereditaria motora distal. El inicio es en la 2^a-3^a década, aunque hay casos con inicio infantil (217). Pese a que se han descrito pacientes con inicio en miembros inferiores, de manera característica los primeros síntomas aparecen en las manos con debilidad y atrofia de la eminencia tenar y primer interóseo dorsal. El inicio puede ser unilateral, pero en poco tiempo de progresión la enfermedad se hace bilateral y unos tres años después aparecen síntomas distales motores en miembros inferiores. Los hallazgos sensitivos siempre son discretos y hay pacientes que no los desarrollan a lo largo de todo el curso de la enfermedad (217). Las deformidades óseas distales son habituales pero la escoliosis es muy poco frecuente. No se ha descrito afectación de pares craneales. La progresión es lenta y no suele conllevar una gran discapacidad (24, 217). Electrofisiológicamente los pacientes presentan unas conducciones motoras con caída de amplitud en miembros superiores (sobre todo en nervio mediano) y en miembros inferiores, con velocidades de conducción preservadas. Las conducciones sensitivas pueden reflejar una leve caída de amplitud principalmente en

nervio sural, pero siempre son registrables (217). Histológicamente se observa una pérdida de fibras mielínicas, especialmente de las de pequeño y mediano calibre. En muchas de ellas se encontraron hallazgos sugestivos de degeneración axonal con múltiples clusters regenerativos. La mielina estaba intacta pese a estar adelgazada en algunas fibras y asociar ocasionales estructuras tipo bulbo de cebolla (217).

23. *HSPB1*: CMT2F.

Las mutaciones en el gen *HSPB1* causan una neuropatía de predominio motor que puede clasificarse como CMT o neuropatía hereditaria motora distal (46, 218). Tal y como ocurría con las mutaciones en *GARS*, incluso hay familias en las que miembros se clasifican como CMT2 y otros como neuropatía hereditaria motora distal (219). En cualquier caso el fenotipo es común, con una edad de debut sintomático variable (desde la infancia hasta pasados los 50 años). Los primeros síntomas suelen ser en miembros inferiores, desarrollando debilidad y atrofia distal en pies y pantorrillas antes que en manos. Los síntomas motores son claramente predominantes sobre los sensitivos pero a medida que progresa la enfermedad, habitualmente aparece hipoestesia distal de las distintas modalidades (220, 221). Suelen existir deformidades óseas distales pero es infrecuente la escoliosis y no se ha descrito afectación de pares craneales. Ocasionalmente pueden encontrarse reflejos vivos pero suelen estar disminuidos o ausentes (221). La progresión es muy variable incluso en una misma familia, pudiendo ocasionar una pérdida de la deambulación independiente o simplemente una debilidad distal poco discapacitante (220). Electrofisiológicamente existe una caída de amplitudes con velocidades de conducción mantenidas de predominio motor y de miembros inferiores. No existen datos histológicos de pacientes con CMT2F.

24. *HSPB8*: CMT2L.

Las mutaciones en *HSPB8* son una causa de CMT2 o neuropatía hereditaria motora distal mucho más infrecuente que las mutaciones en *HSPB1* (47, 222). La edad de inicio suele ser en las 3 primeras décadas con debilidad distal en miembros inferiores. Los síntomas motores predominan sobre los sensitivos y, pese a que pueden llegar a afectar a musculatura proximal, la progresión suele ser lenta. Las deformidades óseas en pies son muy frecuentes y la escoliosis aparece en cerca del 20% de los casos (223, 224). No se ha descrito afectación de pares craneales. Los estudios electrofisiológicos revelan los hallazgos típicos de CMT2 (descenso de amplitudes motoras y sensitivas con velocidades de conducción y latencia conservadas), y en la RM muscular también se encuentra una atrofia muscular longitud dependiente sin asimetrías (223, 224). Histológicamente hay una pérdida de fibras mielínicas principalmente de gran tamaño, con signos de degeneración axonal y clusters regenerativos (223, 224). Con microscopía electrónica se puede comprobar la degeneración axonal al detectarse vacuolización de los axones, así como acúmulos de material granular en axoplasma o disolución de organelas (224).

25. *DNM2*: CMT2M, CMT-DIB.

Las mutaciones en el gen *DNM2* pueden causar una neuropatía hereditaria que puede clasificarse como axonal o intermedia (225). La edad de inicio varía entre la primera década y los 50 años pero suele debutar entre los 15-20 años. Los primeros síntomas aparecen en miembros inferiores con debilidad distal, atrofia y deformidades óseas. La progresión es variable, siendo generalmente leve o moderada, pero hay casos descritos con pérdida de deambulación (225, 226). Las deformidades óseas distales son constantes pero no asocian escoliosis ni afectación de pares craneales. En cambio sí que se han descrito pacientes con alteraciones hematológicas (neutropenia) y/o cataratas asociadas

(225). Las cataratas eran de inicio precoz, o incluso congénitas en una familia, que también asociaba ptosis y oftalmoparesia (225, 227). Los hallazgos neurofisiológicos en estos pacientes son bastante variables y de ahí que se hayan clasificado como CMT2 o CMT intermedio. Las conducciones nerviosas motoras o sensitivas pueden estar moderadamente enlentecidas (hasta 26 m/s en MMSS) o ser normales y las amplitudes suelen estar levemente disminuidas (225). La electromiografía revela una denervación distal, hallazgo que se confirma con la RM muscular, donde se observa una atrofia longitud dependiente en musculatura de pie y pantorrilla (228). Anatomopatológicamente también hay hallazgos compatibles con una afectación combinada axonal y mielínica. Existe una pérdida de fibras mielínicas de gran tamaño, con escasos signos de degeneración axonal, pero frecuentes clusters regenerativos. Aparte, existen fibras nerviosas con pliegues anómalos de mielina y con aumento del tamaño de la hendidura de Schmidt-Lanterman (225). Muy ocasionalmente se han encontrado estructuras tipo bulbo de cebolla con desmielinización segmentaria (229).

26. *AARS*: CMT2N.

Las mutaciones en el gen *AARS* son una causa infrecuente de CMT2 y de neuropatía hereditaria motora distal (60, 230). El fenotipo de la misma aún debe ser confirmado y clarificado pero aparentemente son pacientes con un debut sintomático variable (5 años - edad adulta) e incluso hay pacientes asintomáticos. La sintomatología inicial es motora de miembros inferiores y la progresión de la misma suele ser bastante lenta, raramente afectando a musculatura proximal. Los hallazgos sensitivos son proporcionales a los motores y las deformidades óseas distales son constantes (60, 231, 232). Como características añadidas cabe destacar que se han descrito varios pacientes con calambres y fasciculaciones y, en menor medida, sordera neurosensorial (231). Los estudios

neurofisiológicos revelan unas velocidades de conducción en rango axonal o intermedio (VCMM 32-50 m/s) con reducción de amplitudes (60). No existen datos histológicos de momento.

27. *DYNC1H1*: CMT2O.

Las mutaciones en *DYNC1H1* se han descrito recientemente como causa de CMT axonal (CTM2O), atrofia muscular espinal o, incluso, retraso mental y alteraciones en la migración neuronal (49, 50, 233). La neuropatía sólo se ha descrito en una familia inglesa por lo que el fenotipo aún debe ser confirmado. Aparentemente existe una variabilidad importante y puede existir cierto solapamiento con los otros fenotipos descritos en este gen. La edad de inicio suele ser precoz, con retraso en la adquisición de habilidades motoras en más de la mitad de los pacientes. Aparte, un tercio de ellos presentaban distintos grados de retraso mental o del aprendizaje (49). La debilidad es inicialmente distal de miembros inferiores, pero pueden acabar desarrollando debilidad proximal. Incluso hay un paciente descrito en que el inicio fue proximal, asemejándose a un fenotipo de atrofia muscular espinal (49). La pérdida sensitiva es variable y suele afectar a todas las modalidades, siendo frecuentes las parestesias y el dolor neuropático. Neurofisiológicamente se describen unas velocidades de conducción mantenidas con amplitudes algo disminuidas, sobre todo en las conducciones motoras de MMII. Anatomopatológicamente hay una pérdida de fibras mielínicas, con signos de degeneración y regeneración axonal (49).

28. *LRSAMI*: CMT2P.

Las mutaciones en *LRSAMI* recientemente se han descubierto como causantes de CMT2 (77). Las mismas se pueden heredar de manera recesiva o dominante, pero el fenotipo es indistinguible (78, 234, 235). Habitualmente se produce un inicio sintomático después de los 20 años con debilidad distal en miembros inferiores o calambres y fasciculaciones. Posteriormente el curso es bastante lento con progresión de la debilidad a manos y rara vez a musculatura proximal. Los síntomas sensitivos están presentes pero no predominan sobre los motores salvo en una familia en que el fenotipo fue predominantemente sensitivo (235). Suelen existir deformidades óseas en pies, pero no proximales ni afectación de pares craneales. En algún caso aislado sí se ha descrito afectación autonómica del tipo de disfunción eréctil (234). Aparentemente en todos los casos existe una elevación leve de la creatinquinasa (CK) sanguínea. Los estudios neurofisiológicos revelan unas conducciones motoras con velocidades y latencias mantenidas y amplitudes que pueden estar disminuidas o ser normales. Las conducciones sensitivas ocasionalmente no son registrables y, en cualquier caso, siempre hay una caída importante de la amplitud. Histológicamente se describe una pérdida leve de fibras mielínicas con ocasionales fibras con signos de degeneración axonal y clusters regenerativos (235).

29. *DHTKDI*: CMT2Q.

Las mutaciones en el gen *DHTKDI* se han descrito recientemente como causales de CMT2, así como de varios tipos de aciduria (236, 237). De momento el cuadro sólo se ha encontrado en una familia de origen chino con un fenotipo CMT2 'clásico'. El inicio es entre los 15-25 años con debilidad y atrofia distal en miembros inferiores y la progresión es lenta, afectando a musculatura distal de miembros superiores y escasamente a

musculatura proximal. Asocian pies cavos e hipoestesia de todas las modalidades, pero no escoliosis ni afectación de pares craneales. Las conducciones nerviosas reflejan velocidades de conducción mantenidas y amplitudes motoras y sensitivas disminuidas. Sólo existe información histológica sobre una biopsia de músculo que demuestra fibras anguladas y signos de denervación (236).

30. *YARS*: CMT-DIC.

Las mutaciones en el gen *YARS* son una causa poco frecuente de CMT de características intermedias y existe escasa información sobre el fenotipo (59). Suele debutar en las primeras dos décadas, pero hay pacientes con inicio en la edad adulta. El cuadro es de predominio motor y de miembros inferiores, pero existen signos de pérdida sensitiva en todos los pacientes (238). Las deformidades óseas distales son frecuentes pero no existe información sobre la afectación de pares craneales o de escoliosis. Neurofisiológicamente las velocidades de conducción motora oscilan entre 30 m/s y normales en miembros superiores. Histológicamente se describe una reducción en el número de fibras y en el grosor de la mielina sin apreciarse bulbos de cebolla (238).

31. *INF2*: CMT-DIE.

Las mutaciones en el gen *INF2* son una causa de CMT intermedio asociado a glomerulopatía, que fue descubierta recientemente (92). Los pacientes debutan en las dos primeras décadas con síntomas provocados por la debilidad distal en miembros inferiores (tropiezos, deformidades óseas, etc.). Aproximadamente al mismo tiempo, aparece la nefropatía asociada (glomeruloesclerosis focal segmentaria), que debuta con proteinuria y en 3-5 años acaba desembocando en una insuficiencia renal terminal. Neurológicamente la debilidad progresa a musculatura distal de miembros superiores y, en menor medida, a

musculatura proximal (92, 239). Los síntomas sensitivos son proporcionales a los motores. Como características asociadas se han descrito ocasionalmente sordera neurosensorial, retraso psicomotor o Schwannomas cutáneos (92, 239, 240). Neurofisiológicamente existe una variabilidad importante con velocidades de conducción motora que oscilan entre 20 m/s y valores normales, y amplitudes que generalmente están algo disminuidas. Las conducciones sensitivas pueden estar ausentes o existir un enlentecimiento moderado de las velocidades con amplitudes claramente disminuidas. En la RM cerebral pueden observarse hiperintensidades de sustancia blanca periventricular, con un aumento del tamaño ventricular (92, 239). Mediante una RM muscular de miembros inferiores se puede observar una sustitución grasa de la musculatura del pie y de la pantorrilla (principalmente del grupo anteroexterno) con un patrón longitud dependiente (241). Histológicamente existe una pérdida de fibras mielínicas con abundantes estructuras tipo bulbo de cebolla (92).

32. *GNB4*: CMT-DIF.

Las mutaciones en *GNB4* son una causa reciente de CMT intermedio (242). De momento se ha descrito una familia y un paciente aislado, todos ellos de origen chino. El debut sintomático suele ser en las dos primeras décadas, con tropiezos y debilidad distal en miembros inferiores, afectando progresivamente a musculatura distal de miembros superiores. Asocian disminución de todas las modalidades sensitivas y pies cavos, pero no escoliosis ni disfunción de pares craneales. En la familia descrita las mujeres tenían un fenotipo algo menos grave que los hombres, pero debe confirmarse en otros pedigrís (242). Electrofisiológicamente las conducciones motoras presentan un enlentecimiento variable (VCMM 17-46 m/s) con amplitudes levemente disminuidas, y las conducciones sensitivas tienen latencias distales preservadas y amplitudes disminuidas o ausentes en

miembros inferiores (242, 243). Histológicamente se describe una pérdida de fibras mielínicas principalmente las de gran tamaño, con clusters regenerativos axonales y ocasionales bulbos de cebolla (243).

33. *KARS*: CMT-RIB.

Las mutaciones en *KARS* se han descrito en un único paciente heterocigoto compuesto (244). Se trata de un fenotipo complejo que incluye retraso mental, conductas autolesivas, dismorfia facial, schwannomas vestibulares y neuropatía. La misma es moderada-grave, con predominio distal. Electrofisiológicamente hay un enlentecimiento moderado de las velocidades de conducción (cerca de 40 m/s en MMSS) con descenso importante de las amplitudes motoras (244).

34. *PLEKHG5*: CMT-RIC.

Las mutaciones en *PLEKHG5* se han descrito en tres familias con una variante de CMT intermedia y de herencia recesiva (245, 246). Previamente se habían encontrado mutaciones en este gen en paciente con atrofia muscular espinal distal (247). Los pacientes con estas mutaciones debutan sintomáticamente entre los 7-45 años con debilidad y atrofia distal de miembros inferiores. La progresión es variable pero llega a afectar musculatura distal de miembros superiores y, de forma poco frecuente, a la musculatura proximal de miembros inferiores. Asocian hipoestesia de todas las modalidades, pies cavos y ocasionalmente escoliosis (245, 246). Los estudios electrofisiológicos revelan un enlentecimiento de velocidades de conducción motoras en rangos desmielinizantes o intermedios (VCMM 25-39 m/s) con amplitudes motoras levemente disminuidas y mayor afectación en miembros inferiores. Las conducciones sensitivas también están moderadamente enlentecidas con amplitudes disminuidas. La

RM muscular de miembros inferiores muestra una atrofia muscular con infiltración grasa con un patrón longitud dependiente y mayor afectación del compartimento anterior y lateral de la pantorrilla que el posterior (246). Histológicamente existe una pérdida moderada de fibras mielínicas de gran tamaño con escasos clusters regenerativos y ausencia de bulbos de cebolla. Con microscopía electrónica, aparte de los hallazgos anteriores, se describen escasos plegamientos mielínicos anómalos (246).

35. *AIFMI*: CMTX4.

Recientemente se ha descubierto que la base genética del CMTX4 (síndrome de Cowhock) son las mutaciones en *AIFMI* (248). Se trata de una neuropatía grave descrita en una única familia ítalo-americana que sólo es sintomática en varones. Se inicia en los primeros años de vida y con una debilidad prominente distal > proximal y de predominio en miembros inferiores. Existe hipoestesia de todas las modalidades y deformidades óseas distales. Como características asociadas pueden existir hipoacusia neurosensorial y retraso mental (249). Los estudios de conducción nerviosa revelan velocidades mantenidas en miembros superiores (>50 m/s) y levemente enlentecidas en miembros inferiores con amplitudes disminuidas. Histológicamente se describe una pérdida de fibras mielínicas importante, principalmente de las de gran tamaño (249).

36. *PRPS1*: CMTX5.

Las mutaciones en *PRPS1* se han descrito recientemente como la causa de CMTX5 (88). El fenotipo de dichas mutaciones se ha ido expandiendo en los últimos años, describiéndose también pacientes con síndrome de Arts, sordera neurosensorial no sindrómica, retraso del desarrollo, distrofia retiniana y diabetes insípida (250, 251). Inicialmente se creía que dichos fenotipos estaban claramente diferenciados pero

realmente el espectro fenotípico de la enfermedad es continuo. En la descripción inicial de pacientes con CMTX5 existe una polineuropatía axonal asociada a sordera neurosensorial y atrofia óptica (252, 253). Sólo son sintomáticos los varones y el inicio ocurre en los primeros años con sordera neurosensorial prelingual. Posteriormente, sobre los 10 años, aparecen los síntomas motores y visuales, con debilidad distal de miembros inferiores y disminución de agudeza visual. Los síntomas sensitivos suelen ser menores que los motores y están ausentes en alguno de estos pacientes. También se han descrito pacientes con polineuropatía y sordera pero sin atrofia óptica, u otros pacientes en los que hay un solapamiento con el síndrome de Arts (ataxia, retraso mental, hiperuricemia, inmunodeficiencia, etc.) (254, 255). Neurofisiológicamente las velocidades de conducción motora están levemente enlentecidas o preservadas (>40 m/s en miembros superiores) con caída de amplitudes en miembros inferiores. Las conducciones sensitivas pueden estar ausentes o con amplitudes disminuidas (253, 254). Anatomopatológicamente existe una pérdida de fibras mielínicas de todos los tamaños, adelgazamiento de la mielina y escasos bulbos de cebolla (253).

37. *PDK3*: CMTX6.

Las mutaciones en el gen *PDK3* se han descubierto en una única familia australiana con un fenotipo axonal y una herencia ligada al X (94). En este caso el fenotipo estaba claramente diferenciado según el sexo. Los pacientes varones comenzaron habitualmente en la primera década con problemas para caminar y debilidad distal en piernas. De una manera muy lentamente progresiva se desarrolla debilidad y atrofia en pies y pantorrillas y en musculatura intrínseca de la mano. En cualquier caso, todos los adultos de dicha familia permanecen ambulantes y no tienen debilidad proximal. También se encuentra hipoestesia de todas las modalidades, deformidades óseas en pies y, ocasionalmente,

hipoacusia. Las mujeres pueden ser asintomáticas (cerca del 50%) pero todas tienen alteraciones mínimas en la exploración, fundamentalmente una leve debilidad y atrofia en pies y manos, torpeza en los movimientos o temblor de miembros superiores. Los estudios de conducción nerviosa en varones revelan unas velocidades de conducción motora mantenidas, con descenso de amplitudes sobre todo en miembros inferiores y conducciones sensitivas no registrables. En las mujeres los hallazgos son muy discretos, con leve descenso de amplitudes o incluso normalidad en los estudios de conducción pero signos de denervación en electromiografía (94).

38. *FBLN5*.

Las mutaciones en *FBLN5* son una causa poco frecuente de CMT1, pero también se han descrito en pacientes con degeneración macular senil y cutis laxa (256, 257, 258). De hecho, puede existir un solapamiento entre los tres fenotipos (256). Estos pacientes generalmente tienen un inicio sintomático tardío (> 25 años en todos los pacientes salvo una familia) con debilidad distal de miembros inferiores. La progresión suele ser lenta, afectando sólo a la musculatura distal de extremidades, aunque hay pacientes en los que sí llega a afectarse la musculatura proximal y desarrollan una discapacidad importante. Existen deformidades óseas distales, los hallazgos sensitivos son proporcionales a los motores y parece existir una frecuencia importante de parestesias en miembros superiores más que en inferiores (256, 259).

Como hallazgos asociados puede existir hiperelasticidad cutánea y en un paciente también se encontró degeneración macular (256). Neurofisiológicamente hay un enlentecimiento de las velocidades de conducción en rango desmielinizante (VCMM 15-33 m/s) con alargamiento de latencias distales y amplitudes inicialmente mantenidas (259).

39. *TFG*.

Las mutaciones en *TGF* se han descrito recientemente en familias con CMT y fenotipos claramente diferenciados (260, 261, 262). Entre 2012 y 2013 se describió como la causa genética subyacente a un subtipo concreto de CMT (neuropatía hereditaria sensitiva y motora con afectación proximal dominante) conocida en pacientes japoneses de la isla de Okinawa y en una familia coreana (260, 261). Estos pacientes tienen un debut sintomático en la edad adulta con fasciculaciones, calambres y/o debilidad proximal en miembros inferiores. En todos ellos predomina la debilidad proximal sobre la distal y la evolución es variable, pudiendo llegar a perder la deambulaci3n aut3noma. Asocian atrofia prominente de muslos y arreflexia, pero no existen deformidades 3seas distales y no suelen aparecer s3ntomas bulbares. La hipoestesia aparece con la evoluci3n de la enfermedad y afecta a todas las modalidades, aunque puede predominar la hipopalestesia. Neurofisiol3gicamente existe un descenso de amplitudes motoras con velocidades de conducci3n mantenidas y conducciones sensitivas que frecuentemente no son registrables. Con la electromiograf3a se puede detectar frecuentes fasciculaciones y fibrilaciones, con potenciales de caracter3sticas neurop3ticas. Mediante RM muscular de miembros inferiores se puede comprobar que los primeros m3sculos afectados son el gl3teo menor y mediano, seguido de la musculatura del muslo (principalmente el semitendinoso) y de la pierna (261). Histol3gicamente se describe en el nervio perif3rico una p3rdida de fibras miel3nicas de gran tama3o, con algunas anormalidades del grosor de la mielina y clusters regenerativos. Tambi3n se ha observado p3rdida neuronal en el asta anterior medular, n3cleo dorsal y cordones posteriores (263).

En 2014 se describi3 una familia taiwanesa con una mutaci3n en este gen y un fenotipo CMT2 'cl3sico', totalmente distinta a las descritas previamente (262). La edad de inicio es entre los 28 y 40 a3os con debilidad distal en miembros inferiores y la progresi3n es

bastante lenta, con escasa discapacidad. Existen pies cavos e hipoestesia de todas las modalidades pero no escoliosis ni afectación de pares craneales. Las conducciones nerviosas muestran una neuropatía axonal con caída de amplitud y mantenimiento de velocidades de conducción.

La RM muscular revela una atrofia muscular con sustitución grasa de predominio distal . Histológicamente hay una pérdida de fibras de gran tamaño sin ninguna anomalía mielínica (262).

40. *MARS*.

Las mutaciones en *MARS* se han encontrado recientemente como causa de CMT2 en una única familia (264). El fenotipo debe ser confirmado pero aparentemente hay una penetrancia incompleta, existiendo una paciente asintomática y dos sintomáticos. Los dos pacientes debutaron con síntomas en la edad adulta (50-67 años), que inicialmente eran de predominio sensitivo (dolor neuropático e hipoestesia distal). Prácticamente desde el inicio existía debilidad discreta tanto distal como proximal en miembros inferiores y debilidad distal en miembros superiores. Tanto la debilidad como la hipoestesia progresaron lentamente, necesitando uno de los pacientes apoyo bilateral para caminar. Los estudios de conducción nerviosa revelan una ausencia o reducción de las amplitudes sensitivas y en menor medida motoras, de predominio en miembros inferiores. Las velocidades de conducción son normales. Los hallazgos de la biopsia del nervio sural son compatibles con una neuropatía axonal (264).

41. *HARS*.

Las mutaciones en *HARS* se han descrito recientemente en un paciente esporádico con CMT2 y en uno asintomático, por lo que aún se debe de confirmar que sean una causa de

CMT2 (265). El paciente afecto desarrolló síntomas a los 50 años, siendo inicialmente hipoestesia y posteriormente dolor neuropático. Los síntomas motores eran mínimos y no había atrofia ni pies cavos. Neurofisiológicamente existe un descenso de las amplitudes sensitivas y motoras de predominio en miembros inferiores, con normalidad de las velocidades de conducción (265).

42. *HINT1*.

Las mutaciones recesivas en *HINT1* son una causa de CMT axonal o neuropatía hereditaria motora distal frecuentemente asociada a neuromiotonía (266, 267). El debut sintomático suele ser en la primera década con problemas para caminar por debilidad distal de miembros inferiores o calambres y rigidez muscular. Desde el inicio existe debilidad distal en piernas, así como dificultad para la relajación muscular en manos tras una flexión intensa (miotonía de acción). Habitualmente no se encuentra miotonía de percusión, pero sí calambres ocasionales. La debilidad va progresando con el tiempo afectando a musculatura de miembros superiores e incluso a musculatura proximal (266, 268). Los síntomas sensitivos sólo están presentes en cerca de la mitad de los pacientes y siempre en menor medida que los motores. Neurofisiológicamente se describe un descenso de las amplitudes motoras principalmente en miembros inferiores con velocidades de conducción normales. Las conducciones sensitivas pueden ser normales o asociar un descenso de amplitud moderado. Mediante la electromiografía se pueden observar potenciales de denervación y frecuentes descargas miotónicas o mioquimias en musculatura proximal y distal (neuromiotonía). Los hallazgos histológicos son compatibles con una neuropatía axonal y se describen incluso en pacientes sin anormalidades sensitivas clínicas o neurofisiológicas (266).

43. *TRIM2*.

Las mutaciones en *TRIM2* se han descrito en una única paciente con CMT2 recesivo (269). Es una paciente finlandesa que debutó con leve retraso en la adquisición de habilidades motoras e hipotrofia muscular. Progresivamente apareció debilidad distal en extremidades, hipoestesia de todas las modalidades y deformidades óseas distales. No se describe disfunción de funciones superiores, pares craneales o escoliosis. Los estudios de conducción nerviosa revelan una ausencia de potenciales registrables en miembros inferiores y amplitudes disminuidas con velocidades de conducción normales o levemente enlentecidas en miembros superiores. Histológicamente existe una reducción en el número de fibras mielínicas principalmente de gran tamaño, así como signos inespecíficos de degeneración axonal. Con microscopía electrónica se identifican algunas fibras con un diámetro aumentado y acúmulo de neurofilamentos en el axoplasma (269).

44. *MT-ATP6*.

Las mutaciones en *MT-ATP6* se han descrito recientemente en pacientes con CMT2 (56). También pueden encontrarse en pacientes con diversos fenotipos de enfermedad mitocondrial como el síndrome de Leigh, NARP (neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa), paraparesia espástica, necrosis estriatal, etc. (57). De momento se conocen dos mutaciones que pueden cursar con un fenotipo predominantemente o exclusivamente neuropático (56, 270). Estos pacientes presentan una amplia variabilidad clínica, lo cual se ve reflejado en la edad de inicio, pudiendo ser desde la primera década hasta pacientes adultos asintomáticos. Habitualmente debutan con anomalías en la marcha por debilidad distal de miembros inferiores. La progresión de la debilidad es muy variable, pudiendo afectar a musculatura proximal de miembros inferiores y a manos. Hay pacientes que desarrollan una discapacidad muy importante, quedando confinados a una

silla de ruedas desde la tercera década, mientras que hay otros pacientes asintomáticos. Generalmente asocian pies cavos e hipoestesia distal (en menos de la mitad) y ocasionalmente piramidismo u otros síntomas de afectación mitocondrial como empeoramiento de los síntomas con la fiebre, migraña, problemas de aprendizaje, ataxia, diabetes mellitus, cataratas, etc. (56, 270). Los estudios neurofisiológicos revelan hallazgos compatibles con una polineuropatía sensitivo motora axonal en la mayoría de pacientes (descenso de amplitudes con velocidades de conducción conservadas), pero hay casos con normalidad en las conducciones sensitivas. Histológicamente se describe una pérdida de fibras mielínicas con abundantes bulbos de cebolla (270).

45. CMT2G.

El término CMT2G se utiliza para designar una familia de origen español descrita en 1986 y cuyo defecto genético se desconoce pero su locus es 12q12–q13.3 (271, 272). Se trata de una familia extensa con una neuropatía bastante leve que se inicia entre los 9 y los 76 años (media de 38). Comienza con debilidad distal en piernas y deformidades óseas y progresa muy lentamente, afectando muy rara vez a musculatura de manos pero no a musculatura proximal. Asocia hipoestesia distal de predominio en miembros inferiores pero no afectación de pares craneales ni escoliosis. Neurofisiológicamente las conducciones nerviosas son normales o muy levemente enlentecidas y las amplitudes motoras y sensitivas de miembros inferiores generalmente están disminuidas. Histológicamente se describe una pérdida de fibras mielínicas con gradiente distal > proximal, escasas fibras con adelgazamiento de la mielina, signos de degeneración axonal y clusters regenerativos (271, 272).

46. CMT-DIA.

Se conoce como CMT-DIA a una familia italiana con una variante intermedia de la enfermedad cuya causa genética no se conoce, pero su locus es 10q24.1-q25.1 (273, 274). El debut sintomático se produce habitualmente en la primera década con problemas para caminar y dificultad para ponerse de talones. La debilidad va progresando muy lentamente, afectando a musculatura de miembros superiores en la 4ª-5ª década, y pueden llegar a necesitar apoyo para la deambulación. Asocian pies cavos, hipoestesia distal, temblor en manos, pero no afectación de pares craneales (salvo disartria en 2 pacientes), escoliosis ni otras alteraciones. Neurofisiológicamente existe un enlentecimiento de las velocidades de conducción motora en rango intermedio (VCMM 25-45 m/s) con amplitudes disminuidas principalmente en miembros inferiores. Las conducciones sensitivas muestran hallazgos similares con caída de amplitudes y de velocidades. Histológicamente existe una pérdida de fibras mielínicas con signos de degeneración y regeneración axonal (clusters), pero también áreas en las que la mielina está anormalmente gruesa o se evidencian bulbos de cebolla (273, 274).

47. CMTX2.

Se conoce como CMTX2 a una familia descrita con herencia recesiva ligada al X y cuyo defecto genético se ha relacionado con la región Xp22.2. Únicamente están afectados los varones, que debutan sintomáticamente en la primera década con atrofia y debilidad distal en miembros inferiores. El 40% de los casos asocian retraso mental y no asocian otras características diferenciadoras. Los estudios neurofisiológicos se describen como un enlentecimiento moderado de las velocidades de conducción con signos de denervación (275).

48. CMTX3.

Se conoce como CMTX3 a dos familias descritas con herencia recesiva ligada al X y cuyo defecto genético se ha relacionado con la región Xq26-q28. Sólo están afectados los varones, que debutan sintomáticamente en la edad adulta con atrofia y debilidad distal en miembros inferiores y/o en miembros superiores. En una de las dos familias los pacientes presentan reflejos vivos y signo de Babinski. No asocian retraso mental ni otra característica diferenciadora, pero sí hipoestesia de todas las modalidades y pies cavos . Los estudios neurofisiológicos se describen como un enlentecimiento moderado de las velocidades de conducción con signos de denervación (275).

2) HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

a. Hipótesis de trabajo

La distribución mutacional de pacientes afectados de enfermedad de Charcot-Marie-Tooth evaluados en el Hospital Universitari i Politècnic La Fe (centro de referencia para esta patología en la Comunidad Valenciana) tiene características diferenciadoras con series clínicas descritas en otras regiones.

b. Objetivos

i. Objetivo general:

Describir la distribución mutacional de pacientes con CMT evaluados en el Hospital Universitari i Politècnic La Fe durante el periodo de 1990-2012 y compararla con otras poblaciones. Aportar una descripción clínica y neurofisiológica exhaustiva de los pacientes con diagnóstico genético para poder establecer una correlación genotipo-fenotipo.

ii. Objetivos específicos:

1. Profundizar en la caracterización del fenotipo de pacientes con mutaciones que aporten rasgos diferenciadores con respecto a otras series.
2. Proponer algoritmos diagnósticos para poder orientar el cribaje mutacional de pacientes afectos de enfermedad de Charcot-Marie-Tooth en la Comunidad Valenciana.

3) MATERIAL Y MÉTODOS

a. Población

Se incluyeron a todos los pacientes con el diagnóstico de enfermedad de Charcot-Marie-Tooth evaluados en el Hospital Universitari i Politènic La Fe de Valencia durante el periodo de 1990-2012. Se consideró que padecen CMT los pacientes con neuropatía sensitiva y motora en los que concurría al menos una de las siguientes características:

- Identificación del defecto genético causal.
- Otros miembros de la familia con características clínicas similares.
- Pacientes con neuropatía sensitiva y motora con historia natural, clínica y neurofisiología compatible con CMT en los que se han excluido otras causas de neuropatía.

Se excluyeron del estudio aquellos pacientes afectados de neuropatías hereditarias exclusivamente motoras (neuropatía hereditaria motora distal), o exclusivamente sensitivas y autonómicas (neuropatía hereditaria sensitiva y autonómica), así como los pacientes con neuropatía hereditaria con predisposición a las parálisis por compresión (NHPP), neuralgia amiotrófica hereditaria o aquellos síndromes complejos en los que la neuropatía no era la característica clínica predominante (amiloidosis, ataxia recesiva de Charlerioix-Sauvignon, etc.).

Los pacientes se clasificaron según el patrón de herencia en autosómico dominante, autosómico recesivo, ligada al cromosoma X o esporádico; y según la velocidad de conducción motora del nervio mediano en CMT1 o desmielinizante (VCMM < 38m/s) o CMT2 o axonales (VCMM > 38m/s). Si el potencial de acción motor (CMAP) estaba abolido o con una amplitud muy disminuida (<0,5mV) se clasificaron según los parámetros neurofisiológicos de la conducción nerviosa a músculos más proximales o según las características anatomopatológicas.

b. Evaluación clínica

En el Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia la evaluación clínica de los pacientes con neuropatías hereditarias está protocolizada, de manera que incluye un cuestionario cerrado sobre los síntomas y signos referidos por el paciente y una exploración física detallada (apéndice). Estas evaluaciones se realizan al menos una vez al año e incluyen una exploración neurológica y física general, seguido de una evaluación de:

- Función motora: compuesta por una gradación de la fuerza de 20 grupos musculares utilizando la escala estandarizada del Medical Research Council (MRC) y la apreciación de atrofas musculares en extremidades.
- Función sensitiva: incluye la exploración de la sensibilidad táctil fina, algésica, vibratoria y posicional de las extremidades.
- Reflejos profundos en las 4 extremidades.
- Deformidades asociadas: Tanto distales (pie cavo, dedos en martillo, retracción aquilea, manos en garra, etc.) como proximales (escoliosis, etc.).

Aparte de la exploración pormenorizada, desde 2006 se utiliza la escala global de neuropatías hereditarias CMT neuropathy score (CMTNS) que incluye elementos clínicos (síntomas y signos) y neurofisiológicos y fue diseñada justamente para analizar la historia natural de esta enfermedad (109). Para evaluar la situación funcional se usa la functional disability scale (FDS) desde 2009. Asimismo se han tratado de extrapolar los datos previos a dichas escalas (17).

c. Protocolo neurofisiológico

Los estudios neurofisiológicos se realizaron a todos los probandos y a la mayoría de familiares en al menos una ocasión e incluyeron un estudio de conducciones nerviosas sensitivas y motoras registradas con electrodos de superficie, y una electromiografía con aguja concéntrica. Se ejecutaron siempre por la misma neurofisióloga experta, en equipos similares y siguiendo el mismo protocolo. Las conducciones motoras se registraron en los nervios mediano, cubital, radial, peroneal, tibial posterior y axilar obteniendo la amplitud, latencia distal y velocidad de conducción. Si la amplitud de la conducción nerviosa motora a músculos distales fue $< 0,5$ mV, se midieron también los mismos parámetros en músculos más proximales (palmar largo, flexor cubital del carpo, etc.). Asimismo, en esas ocasiones se midió la latencia y amplitud de la conducción nerviosa sobre el diafragma mediante la estimulación en el cuello. Las conducciones sensitivas se exploraron en los nervios mediano, cubital, radial, peroneal y sural, de manera ortodrómica en todos ellos salvo en el nervio sural, en que se realizó de manera antidrómica, registrándose en todos ellos la amplitud y la velocidad de conducción nerviosa sensitiva. El estudio electromiográfico incluyó un registro de la actividad muscular en reposo, con contracción sostenida y con esfuerzo máximo en al menos dos grupos musculares de cada extremidad.

d. Estudios anatomopatológicos

Los estudios anatomopatológicos de nervio sural no se realizaron de manera rutinaria ni con fines investigacionales, sino solamente cuando existían dudas razonables sobre el diagnóstico del paciente. La biopsia de nervio sural se realizó en quirófano con anestesia local, obteniendo una muestra de 2-3 cm a nivel del tobillo. Luego se fijó inicialmente en glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 1% en 0,1M de cacodilato sódico y, en

segunda instancia, en tetraóxido de osmio al 1%. Posteriormente, se deshidrató e introdujo en resina epoxi para realizar cortes semifinos teñidos con azul de toluidina y cortes ultrafinos contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cortes semifinos se analizaron a distintos aumentos con microscopía óptica y mediante técnicas morfológicas con el software Scion image analyst software (<http://www.scioncorp.com>), determinándose la densidad de fibras nerviosas, grosor de la vaina de mielina, g-ratio, la presencia de alteraciones de la compactación de mielina, bulbos de cebolla o clusters de regeneración axonal, etc. Los cortes ultrafinos fueron estudiados con microscopía electrónica para observar la ultraestructura del axón, así como de vaina de mielina que lo rodea.

e. Resonancia magnética muscular de miembros inferiores

La resonancia magnética muscular de miembros inferiores no se realizó de manera rutinaria, sino que se seleccionaron aquellos pacientes en los que podía aportar información importante para definir el fenotipo. El protocolo que se utilizó fue diseñado expresamente para pacientes con neuropatías e incluye cortes axiales y longitudinales de pies, piernas y, ocasionalmente, muslos. Se utilizó un aparato de 1.5-Teslas MR platform Siemens Avanto (Erlangen, Alemania), realizando secuencias T1 y STIR (Short T1 Inversion Recovery) en al menos un plano, y una secuencia T1 fat-sat antes y después de la inyección de contraste paramagnético. Se evaluó la alteración en la intensidad de señal muscular para determinar la presencia de edema muscular, realce anormal de contraste y/o infiltración grasa, graduando esta última según una escala semicuantitativa de 0-4 (276). Se valoraron por separado la musculatura de pies, los cuatro compartimentos de la pierna (compartimento anterior: músculos tibial anterior, extensor hallucis longus, y extensor largo de los dedos; compartimento lateral: músculos peroneo largo y corto;

compartimento superficial posterior: músculos soleo y gastrocnemius y compartimento profundo posterior: músculos tibial posterior, flexor largo de los dedos y flexor hallucis longus) y los muslos.

f. Análisis Genéticos

Los análisis genéticos se han podido realizar gracias a la colaboración con el departamento de genética y genómica de enfermedades neuromusculares perteneciente al programa de genética y enfermedades raras del Centro de Investigación Príncipe Felipe (previamente el departamento de Genética y Medicina Molecular del Instituto de Biomedicina de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas). Dicho grupo está liderado por el Dr. Francesc Palau, e integrado por la Dra. Carmen Espinos y otros colaboradores que han realizado el trabajo de secuenciación y diagnóstico genético de los pacientes. El protocolo utilizado ha ido evolucionando a medida que se ha ido ampliando el conocimiento de la enfermedad y han aparecido nuevas técnicas de secuenciación masiva. En cualquier caso, el ADN de cada uno de los pacientes y sus familiares se extrajo mediante métodos estándar tras la firma de un consentimiento informado para el estudio genético. En todos los probandos, independientemente del fenotipo, se procedió al estudio de la duplicación del gen *PMP22* (CMT1A) mediante MLPA (Multiplex Ligation- dependent Probe Amplification) empleando el kit comercial P033B (MRC-Holland) en un analizador genético ABI Prism 3130xl (Applied Biosystem). Una vez descartada la duplicación CMT1A se procedió al análisis mutacional de los genes implicados en CMT. Para ello:

- 1) En algunos casos se dio prioridad al análisis de un gen de acuerdo con las características clínicas, neurofisiológicas y patrón de herencia.
- 2) Si no era posible, se procedió al análisis sistemático de genes implicados en CMT según el orden de prevalencia de estos genes en series de pacientes CMT estudiadas en otras poblaciones europeas.
- 3) Finalizado este análisis se estudiaron otros genes poco frecuentes implicados en la neuropatía de CMT.

De esta manera en los pacientes caucásicos con CMT desmielinizante se estudiaron los genes: *PMP22*, *GJB1*, *MPZ*, *GDAP1*, *SH3TC2*, *FGD4*, *NEFL*, *LITAF*, *FIG4*, *ERG2*, *PRX1*, *MTMR2*, *MTMR13*, *PRPS1*, *DNM2*, *YARS* y *SOX10*. En los pacientes caucásicos con CMT axonal, se estudiaron los genes: *MFN2*, *GJB1*, *MPZ*, *GDAP1*, *HSPB1*, *HSPB8*, *LITAF*, *NEFL*, *DNM2*, *GARS*, *AARS1*, *KARS*, *YARS*, *TRPV4*, *RAB7*, *MED25* (sólo se estudió la mutación fundadora p.A335V), *LMNA* (sólo se estudió la mutación fundadora p.R298C) y *RSAM*. Por último en la población gitana desmielinizante se analizaron exclusivamente las mutaciones fundadoras asociadas a esta etnia: p.R148X en el gen *NDRG1*, p.R1109X y p.C737_P738delinsX en el gen *SH3TC2*, y g.9712G>C en el gen *HK1*.

Cada gen se analizó tras una amplificación mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) de cada uno de los exones codificantes y sus regiones intrónicas flanqueantes. Los cebadores empleados se diseñaron y revisaron mediante el software Gene Runner vs. 3.05 (<http://www.generunner.net>). El análisis mutacional de cada uno de los genes estudiados se llevó a cabo mediante DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography, Transgenomic WAVE® System) y los patrones anómalos detectados se secuenciaron en un analizador genético ABI Prism 3130xl (Applied Biosystem). Los

electroforegramas se visualizaron con la herramienta informática Chromas 2.33 y las secuencias se analizaron mediante alineamiento con la secuencia salvaje empleando el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Adicionalmente se analizó la región 5'UTR y promotora (hasta -900 pb desde el codón de inicio de transcripción) del gen *GJBI* y en los genes *MPZ* y *GJBI* se analizó la existencia de posibles cambios debidos a grandes deleciones y/o duplicaciones mediante MLPA empleando los kits comerciales P143 y P129(MRC-Holland) en un analizador genético ABI Prism3130xl (Applied Biosystem).

Cada cambio nucleotídico se nombró de acuerdo con la pauta de lectura abierta (Open Reading Frame, ORF) de las secuencias de referencia de ADN complementario (cDNA) utilizadas. Las variaciones identificadas se investigaron mediante análisis de segregación si se disponía de muestra de familiares y si el cambio era novel se compararon con 200 cromosomas de individuos sanos de ancestro español (Banco Nacional de ADN).

Para investigar la posible patogénesis de los cambios noveles se emplearon los software SIFT (<http://blocks.fhrc.org/sift/SIFT.html>) y Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>) en el caso de cambios de aminoácido y en el caso de tratarse de un cambio que afectara a una región de procesado de RNA los software NNSPLICE (http://fruitfly.org:9005/seq_tools/splice.html) y Splice View (<http://bioinfo.itb.cnr.it/oriel/splice-view.html>).

g. Aspectos éticos

El proyecto incluye dos aspectos claramente diferenciados, la caracterización fenotípica y los análisis genéticos. El primero se realiza en el contexto de un seguimiento clínico habitual, sólo que de una manera más concienzuda y protocolizada, no suponiendo

perjuicio alguno para el paciente. Las pruebas complementarias invasivas (estudios neurofisiológicos, biopsia del nervio sural, etc.) sólo se realizaron si era indispensable para el diagnóstico y nunca cuando ya existía un diagnóstico genético o sólo para seguimiento. En cualquier caso, a los pacientes se les pidió que firmasen un consentimiento informado aprobado por el comité ético del Hospital Universitari i Politècnic La Fe para poder utilizar sus datos clínicos en una base de datos propia y para poder incorporarlos a una base de datos de ámbito nacional (<http://www.pubgile.com/ciber/neuropatiashereditarias>).

Los estudios genéticos se realizaron en pacientes y ocasionalmente en familiares aparentemente no afectados, siempre tras informar de la naturaleza del diagnóstico genético así como de sus consecuencias tanto personales como familiares. Asimismo se les explicó claramente que en estos momentos no existe ningún tratamiento aprobado para la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. Previa a la extracción de sangre los pacientes firmaron un consentimiento informado explicativo y se reiteró que en cualquier momento podían retirarlo si lo creían conveniente.

4) RESULTADOS

a. Artículo I:

Charcot-Marie-Tooth disease: genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series.

Sivera R, Sevilla T, Vílchez JJ, Martínez-Rubio D, Chumillas MJ, Vázquez JF, Muelas N, Bataller L, Millán JM, Palau F, Espinós C.

Neurology. 2013 Oct 29;81(18):1617-25.

Charcot-Marie-Tooth disease

Genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series

Rafael Sivera, MD*
Teresa Sevilla, MD, PhD*
Juan Jesús Vélchez, MD,
PhD
Dolores Martínez-Rubio,
MBChB
María José Chumillas,
MD
Juan Francisco Vázquez,
MD
Nuria Muelas, MD, PhD
Luis Bataller, MD, PhD
José María Millán, PhD
Fancesc Palau, MD, PhD
Carmen Espinós, PhD

Correspondence to
Dr. Sevilla:
sevilla_ter@gva.es

ABSTRACT

Objectives: To determine the genetic distribution and the phenotypic correlation of an extensive series of patients with Charcot-Marie-Tooth disease in a geographically well-defined Mediterranean area.

Methods: A thorough genetic screening, including most of the known genes involved in this disease, was performed and analyzed in this longitudinal descriptive study. Clinical data were analyzed and compared among the genetic subgroups.

Results: Molecular diagnosis was accomplished in 365 of 438 patients (83.3%), with a higher success rate in demyelinating forms of the disease. The CMT1A duplication (*PMP22* gene) was the most frequent genetic diagnosis (50.4%), followed by mutations in the *GJB1* gene (15.3%), and in the *GDAP1* gene (11.5%). Mutations in 13 other genes were identified, but were much less frequent. Sixteen novel mutations were detected and characterized phenotypically.

Conclusions: The relatively high frequency of *GDAP1* mutations, coupled with the scarceness of *MFN2* mutations (1.1%) and the high proportion of recessive inheritance (11.6%) in this series exemplify the particularity of the genetic distribution of Charcot-Marie-Tooth disease in this region. *Neurology*® 2013;81:1-9

GLOSSARY

AD = autosomal dominant; **AR** = autosomal recessive; **CMT** = Charcot-Marie-Tooth; **MMNCV** = median motor nerve conduction velocity.

Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease refers to the genetically heterogeneous group of hereditary motor and sensory neuropathies. It is one of the most common inherited neurologic disorders, with a prevalence of 15.2 to 40 cases per 100,000.¹⁻³ Molecular studies have provided an ever-growing list of more than 40 involved genes and loci (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/>, <http://neuromuscular.wustl.edu/>, both accessed June 24, 2013). Most of the patients with CMT disease have autosomal dominant (AD) inheritance, but many have X-linked or autosomal recessive (AR) inheritance. CMT disease can be classified according to clinical, electrophysiologic, and nerve pathology findings into demyelinating forms (CMT1, CMT4), with a median motor nerve conduction velocity (MMNCV) of <38 m/s and pathologic evidence of nerve fiber demyelination; and axonal forms (CMT2), with preserved conduction velocities (MMNCV >38 m/s) and pathologic signs of axonal degeneration and regeneration.⁴ An intermediate type (CMT-I) is accepted in which MMNCV lies between 25 and 45 m/s and nerve pathology shows axonal and/or demyelinating features.⁵

Clinically, the most frequent CMT phenotype is characterized by progressive distal weakness and sensory loss appearing toward the second decade, with foot deformities and absent reflexes. However, other patients develop a much more severe form with onset in infancy or early

*These authors contributed equally to this work.

From the Departments of Neurology (R.S., T.S., J.J.V., J.F.V., N.M., L.B.), Clinical Neurophysiology (M.J.C.), and Genetics (J.M.M.), Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (T.S., J.J.V., M.J.C., N.M., L.B.), Valencia; Departments of Medicine (T.S., J.J.V.) and Genetics (C.E.), University of Valencia; Program in Rare and Genetic Diseases (D.M.-R., F.P., C.E.), Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (D.M.-R., J.M.M., F.P., C.E.), Valencia; IBV-CSIC Associated Unit at CIPF (D.M.-R., F.P., C.E.), Valencia; and School of Medicine (F.P.), University of Castilla-La Mancha, Ciudad Real, Spain.

Go to Neurology.org for full disclosures. Funding information and disclosures deemed relevant by the authors, if any, are provided at the end of the article.

childhood and great disability within a few years, or a milder course with few symptoms until adulthood. This clinical heterogeneity, coupled with the expanding genetic diversity, is the complex scenario of the inherited neuropathies. Comprehensive clinical series, in which at least the most frequent genes have been studied, are needed to shed light on the populational genetic distribution and genotype-phenotype correlation in CMT disease.^{6,7} Herein, we present the genetic distribution and phenotypic characterization of an extensive series of CMT disease after an exhaustive genetic screening in the Region of Valencia, a geographically well-defined Mediterranean area.

METHODS Subjects. This is a longitudinal descriptive study, which includes all of the patients with the diagnosis of CMT disease and evaluated at the inherited neuropathy clinic of Hospital Universitari i Politècnic La Fe in Valencia from 2000 to 2012. Patients with sensory-motor neuropathy were considered to have CMT disease if a) a causative genetic defect was determined, b) family members with similar characteristics were detected, or c) sporadic cases were included if their medical history, examination, and neurophysiology were compatible with CMT disease, and other known causes of acquired neuropathy were reasonably discarded. Patients with inherited neuropathies with exclusive motor (distal hereditary motor neuropathies) or sensory and autonomic (hereditary sensory and autonomic neuropathies) signs were excluded from this study, as well as those with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies, and those with complex disorders in which neuropathy was not the most predominant phenotypic feature. Patients were subclassified with demyelinating or axonal CMT disease according to MMNCVs of the proband, except when the amplitudes of median compound motor action potentials were reduced >90%. In those cases, the conduction velocities to nerves innervating proximal muscles were measured (palmaris longus for the median nerve, flexor carpi ulnaris for the ulnar nerve, etc.), and occasionally latencies of other proximal nerves such as the axillary nerve, or pathological evidence were considered.

Standard protocol approvals, registrations, and patient consents. This study protocol was approved by the Institutional Review Board of the Hospital Universitari i Politècnic La Fe. Written informed consents were obtained from all of the members included in this study.

Clinical assessments. The clinical assessment included strength, muscular atrophy, sensory loss, reflexes, foot deformities, as well as a general and neurologic examination. Muscle strength was graded using the standard Medical Research Council scale. CMT neuropathy score was recorded in all patients followed since 2006,⁸ and the Functional Disability Scale score in those after 2000⁹; previous clinical data were extrapolated to CMT neuropathy score and Functional Disability Scale score when possible. Comprehensive electrophysiologic studies were performed in 401 of 438 patients (91.6%), and were not performed only when the genetic diagnosis of another family member was already available. Lower limb muscle MRI and sural nerve biopsy were performed only when there were reasonable doubts regarding the clinical diagnosis or for investigational purposes, and followed the protocols described previously.¹⁰

Mutational analysis. Blood samples were drawn and genomic DNA was obtained by standard methods from peripheral white blood cells. In all of the probands, the CMT1A duplication was analyzed by MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, SALSA kit P033 CMT1; MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands) in a genetic analyzer ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA). Once the CMT1A duplication was discarded, a mutational screening of genes involved in CMT disease was performed taking into account the ethnicity of the proband and the phenotype. In patients with Gypsy ethnicity, the genetic testing strategy was planned as described previously.¹¹ In Caucasian patients, the mutational screening was clinically oriented, and included the genes detailed in table 1 until the causative mutation was identified or all of the genes had been analyzed.

The mutational screening was performed by amplification of all exons and their intronic flanking sequences, except in the *GJB1* gene in which the promoter sequence has also been analyzed. The Gene Runner version 3.05 software was used for designing primers (available on request). The PCR products were analyzed by using denaturing high-performance liquid chromatography (WAVE System; Transgenomic Inc., Omaha, NE), and the anomalous patterns were investigated by Sanger sequencing (ABI Prism 3130xl). Finally, in both the *MPZ* and the *GJB1* genes, large deletions and/or duplications were investigated by

Table 1 Genes analyzed in the mutational screening

CMT1		
Caucasian	Gypsy	CMT2
<i>PMP22</i>	<i>SH3TC2</i> ^a	<i>MFN2</i>
<i>GJB1</i>	<i>NDRG1</i> ^a	<i>GJB1</i>
<i>MPZ</i>	<i>HK1</i> ^a	<i>MPZ</i>
<i>GDAP1</i>		<i>GDAP1</i>
<i>SH3TC2</i>		<i>HSPB1</i>
<i>FGD4</i>		<i>HSPB8</i>
<i>NEFL</i>		<i>LITAF</i>
<i>LITAF</i>		<i>NEFL</i>
<i>GAN1</i>		<i>DNM2</i> ^b
<i>BSCL2</i>		<i>GARS</i>
<i>FIG4</i>		<i>AARS</i>
<i>ERG2</i>		<i>KARS</i>
<i>PRX</i> ^b		<i>YARS</i>
<i>MTMR2</i>		<i>TRPV4</i>
<i>MTMR13</i>		<i>RAB7</i>
<i>PRPS1</i>		<i>MED25</i> ^a
<i>DNM2</i> ^b		<i>LMNA</i> ^a
<i>YARS</i>		<i>LRSAM1</i>
<i>SOX10</i>		

Abbreviation: CMT = Charcot-Marie-Tooth.

^aOnly founder mutations were analyzed: *SH3TC2* p.C737_P738delinsX, *SH3TC2* p.R1109X, *NDRG1* p.R148X, *HK1* g.9712G>C, *MED25* p.A335V, and *LMNA* p.R298C.

^bMore than one sequence reference was used because of the presence of isoforms.

MLPA using the SALSA kits P143 and P129 (MRC-Holland) in an ABI Prism 3130xl autoanalyzer. We did not screen *MT-ATP6*, *PDK3*, *DHTKD1*, *GNB4*, or *TRIM2* genes because they had not been described when this project was concluded.^{12–16}

When possible, segregation analyses within the families were performed, and novel mutations were analyzed in 200 chromosomes from healthy controls of Spanish ancestry. The biological relevance of the amino acid changes was studied using both SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>, accessed June 24, 2013) and PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>, accessed June 24, 2013) programs. When the detected alteration modified a splicing sequence, we used the NNSPLICE (http://fruitfly.org:9005/seq_tools/splice.html, accessed June 24, 2013) and the Splice View (http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwspliceview_ex.html, accessed June 24, 2013) software.

RESULTS A total of 1,009 patients were evaluated at our inherited neuropathy clinic during the timeframe 2000 to 2012; 438 of them were considered to have CMT disease and met our inclusion criteria. All were Spanish, and 401 of them (91.6%) were currently living or had ancestral roots in the Region of Valencia, in the Western Mediterranean area. Initially, 275 (62.8%) were classified as demyelinating CMT, and 163 (37.2%) as axonal CMT. Regarding the inheritance pattern, 242 (55.3%) were considered as AD, 51 (11.6%) were AR, 52 (11.9%) were X-linked, and 93 (21.2%) were considered sporadic. Genetic diagnosis was achieved in 365 of 438 patients (83.3%), with a higher success rate in the demyelinating forms (263/275; 95.6%) over the axonal forms (102/163; 62.6%). The causative mutations were detected in 214 of 242 patients (88.4%) with AD inheritance, 45 of 51 (88.2%) with AR inheritance, 52 of 52 (100%) with X-linked inheritance, and in only 54 of 93 (58.1%) with a sporadic presentation. In table 2, the detailed genetic diagnosis can be analyzed and compared with the latest published data, and in the figure, the distribution according to CMT subtype is shown. All of the genetic and clinical information has also been recorded in a readily accessible mutation database (<http://www.treat-cmt.es/db>, accessed June 24, 2013).

Patients with demyelinating CMT disease. Of the 275 patients with demyelinating CMT disease, 241 were of Caucasian ethnicity and 34 were of Gypsy origin. Of the Caucasian patients with the demyelinating form, 184 (76.3%) carried the CMT1A duplication, which is the most frequent cause of CMT disease. In the remaining 57 Caucasian patients, the disease causing mutation was identified in 45 with the following distribution: 25 mutations in *GJB1*, 9 in *MPZ*, 4 in *PRX*, 2 point mutations in *PMP22*, 2 in *FGD4*, 2 in *SH3TC2*, and 1 in *NEFL*. Six novel mutations were detected in demyelinating CMT (table 3). Once the genetic screening was performed, the causative change remained unknown in 12 patients (4.9%). No mutations were

Table 2 Genetic distribution and comparison to other series

Gene	No. of patients (frequency, %)		
	Present study	Saporta et al. ⁶	Murphy et al. ⁷
<i>PMP22</i> ^a	184 (48.8)	290 (55)	168 (63.2)
<i>GJB1</i>	56 (14.9)	80 (15.2)	46 (17.3)
<i>GDAP1</i>	42 (11.1)	6 (1.2)	2 (0.8)
<i>SH3TC2</i>	27 (7.2)	3 (0.6)	5 (1.9)
<i>MPZ</i>	19 (5.0)	45 (8.5)	13 (4.9)
<i>NDRG1</i>	7 (1.9)		
<i>HSPB1</i>	7 (1.9)		2 (0.8)
<i>MFN2</i>	6 (1.6)	21 (4.0)	12 (4.5)
<i>HK1</i>	5 (1.3)		
<i>NEFL</i>	4 (1.1)	4 (0.8)	2 (0.8)
<i>GARS</i>	4 (1.1)	3 (0.6)	
<i>PRX</i>	4 (1.1)	1 (0.2)	
<i>HSPB8</i>	3 (0.8)		
<i>PMP22</i> ^b	2 (0.5)	5 (1.0)	6 (2.3)
<i>FGD4</i>	2 (0.5)		
<i>KARS</i>	1 (0.3)		
<i>YARS</i>	1 (0.3)		
<i>TRPV4</i>	1 (0.3)		3 (1.1)
<i>LITAF</i>		5 (1.0)	4 (1.5)
<i>MTMR2</i>			1 (0.4)
<i>GAN</i>			1 (0.4)
<i>BSCL2</i>			1 (0.4)
<i>FIG4</i>		2 (0.4)	

^aCarriers of the CMT1A duplication.

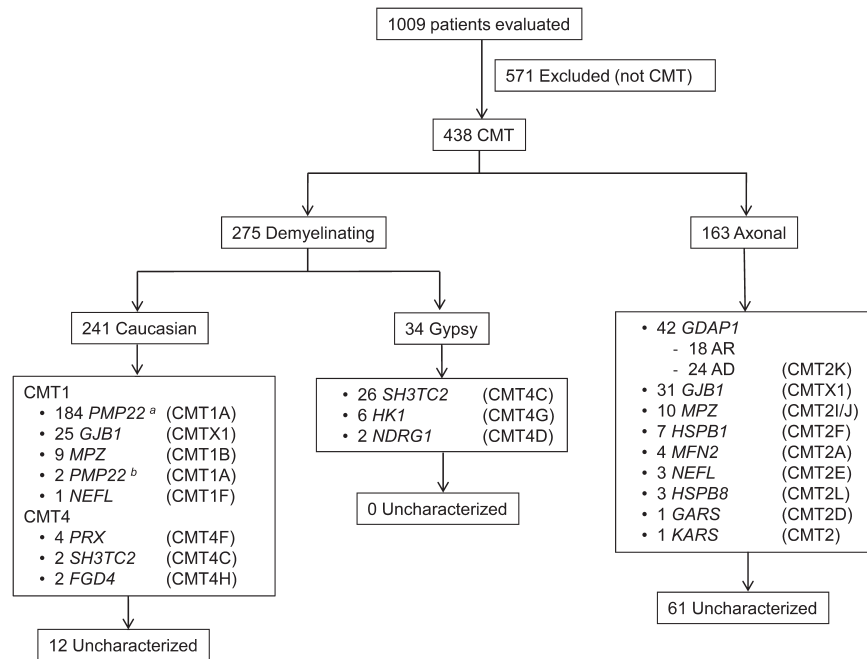
^bCarriers of point mutations in the *PMP22* gene.

identified in any of the following genes: *LITAF*, *EGR2*, *GDAP1*, *MTMR2*, *MTMR13*, *FIG4*, *PRPS1*, *DNM2*, *YARS*, and *SOX10*. In the Gypsy population, the disease-causing mutation was identified in all cases, and consisted exclusively of founder mutations related to CMT disease in the Gypsy population.¹¹

Table 4 shows the relevant clinical features associated with AR forms of demyelinating CMT disease (CMT4). These forms have certain common characteristics such as early onset, delayed motor development, and severe disability, but other features differ between the CMT4 subtypes.

Patients with axonal CMT disease. The mutational screening detailed in table 1 led to identification of the disease-causing mutation in 102 of 163 patients with axonal CMT disease (62.6%). In this set of patients, there is a marked genetic heterogeneity, with mutations in the *GDAP1* and *GJB1* genes being the 2 most frequent causes of axonal CMT disease. Mutations in the *GDAP1* gene correspond to 24 patients

Figure Genetic characterization of CMT disease subtypes



Patients evaluated at the inherited neuropathy clinic during the timeframe 2000–2012. ^a Carriers of the CMT1A duplication. ^b Carriers of point mutations in the *PMP22* gene. AD = autosomal dominant; AR = autosomal recessive; CMT = Charcot-Marie-Tooth.

(14.7% of CMT2) with AD inheritance (caused by the p.R120W mutation in all cases except one) and 18 patients (11.0%) with AR inheritance and diverse genotype. All of our patients with *GDAP1* mutations were defined as CMT2 because the neurophysiologic findings were clearly axonal, although the pathology included both axonal features (fiber loss, axonal degeneration, few regenerative clusters, etc.) and myelin abnormalities (thin myelin sheaths, abnormal myelin folding, occasional onion bulb–like formations). Patients with AR inheritance developed a severe phenotype with important disability, vocal cord, and diaphragmatic palsies whereas patients with dominant *GDAP1* mutations presented with a mild to moderate phenotype with certain clinical and MRI particularities reported previously.¹⁰

Mutations in the *GJB1* gene were detected in 31 patients with axonal CMT disease (19.0%). It is interesting to note that although the patients were classified as having demyelinating or axonal CMT disease according to the MMNCVs of the proband, more than 80% of these families would be classified as having intermediate forms of CMT disease.

The remaining mutations were actually quite rare, accounting for only 29 cases (17.8%), and are distributed

among several genes: 10 patients with mutations in *MPZ*, 7 in *HSPB1*, 4 in *MFN2*, 3 in *HSPB8*, 3 in *NEFL*, 1 in *GARS*, and 1 in *KARS*. In the aggregate, 25 different mutations were identified in the CMT2 series and 10 of them were novel (table 3). Once the mutational screening was performed, the disease-causing mutation remained unknown in 61 patients (37.4%). No change was identified in the following genes: *RAB7*, *DNM2*, *YARS*, *AARS*, *LRSAMI*, and *TRPV4*, nor the founder mutations *MED25* p.A335V or *LMNA* p.R298C.

DISCUSSION A thorough genetic screening has been performed in an extensive clinical series of patients with CMT disease in a Western Mediterranean area. Overall, a molecular diagnosis was achieved in 83.3%, with a higher success rate in demyelinating than in axonal CMT disease. In demyelinating patients, these rates are comparable to the other series in which a comprehensive genetic screening was performed (table 2),^{6,7,17} suggesting that few genes involved in this form of CMT disease remain undiscovered. However, in CMT2, although the success rate is higher than in other series, 37.4% of patients remain without genetic diagnosis. The mutational distribution described confirms the

Table 3 Novel mutations with detailed assessments and conduction velocities of the probands, and phenotypic peculiarities

Gene	Mutation		Presentation	No. of patients	Onset, y	Age at exam, y	CMTNS	FDS	MMNCV (m/s)	Phenotypic characteristics
	Nucleotide	Amino acid (aa)								
GJB1	c.44_45delinsTT	p.R15L	X-linked	3	20	59	14	3	36.1	Early distal upper limb atrophy and weakness. Intrafamily variability regarding severity.
	c.529G>A	p.V177M	Sporadic	1	18	34	14	1	30	Early distal upper limb atrophy and weakness.
	c.-540C>G	No aa change	X-linked	10	26	36	15	2	31	Lower limb distal weakness earlier and more prominent than upper limb. Includes 2 asymptomatic women.
	c.484dupA	p.M162NfsX81	X-linked	2	15	34	13	2	40	Early distal upper limb atrophy and weakness.
	c.141_143dupGAA	p.K48_S49insK	X-linked	4	24	44	12	2	41	Early distal upper limb atrophy and weakness. Brisk reflexes only in proband.
SH3TC2	c.3305delA (hom) ^a	p.H1102LfsX14 ^a	Sporadic	1	9	43	15	3	27	Early sensory ataxia, scoliosis. Lower > upper limb distal weakness and atrophy. No hearing loss.
PRX	c.589G>T; c.642insC	p.E197X; p.R215QfsX8	AR	2	2	42	27	8	4	Early onset, sensory ataxia, scoliosis. Refractory trigeminal neuralgia in 1/2. Few motor signs.
FGD4	c.1886delGAAA (hom)	p.K630NfsX5	AR	2	3	34	14	4	11	Early onset but slow progression. Sensory ataxia. Lower > upper limb distal weakness and atrophy. Spinal syringomyelia in 1/2.
GDAP1	c.1031T>G; c.487C>T ^b	p.L344R; p.Q163X ^b	Sporadic	1	12	49	12	2	57	Mild phenotype for a recessive mutation. Distal lower limb weakness, no vocal cord or diaphragmatic palsy.
			AD	2	22	40	11	2	52	Classic CMT2 phenotype, moderate instability.
MFN2	c.306dupT	p.G103WfsX41	AD	2	22	40	11	2	52	Classic CMT2 phenotype, moderate instability.
	c.752C>T	p.P251L	Sporadic	1	25	47	13	2	51	Classic CMT2 phenotype.
MPZ	c.21_26dupTGGGGG	p.P9_A10dup	AD	2	30	39	9	1	54	Proband with mild phenotype and his father is mostly asymptomatic. Upper limb reflexes are present.
NEFL	c.293A>C	p.N98T	Sporadic	1	3	54	26	8	44	Early onset, severe phenotype. Hearing loss. Wheelchair bound in the 4th decade, death at 58 y.
	c.1315T>A	p.F439I	Sporadic	1	23	41	8	2	45	Early distal upper limb atrophy and weakness. Brisk reflexes.
GARS	c.1171C>T	p.R391C	Sporadic	1	18	39	10	1	53	Early distal upper limb atrophy and weakness. Brisk reflexes. Motor > sensory involvement.

Abbreviations: AD = autosomal dominant; AR = autosomal recessive; CMT = Charcot-Marie-Tooth; CMTNS = CMT neuropathy score; FDS = Functional Disability Scale; hom = homozygous; MMNCV = median motor nerve conduction velocity (normal values in our laboratory >51.6 m/s).

^aWe cited this mutation in Lupo et al.,³⁶ but clinical features were not included.

^bThis mutation has been widely described; we have included it because this patient is a compound heterozygote for a novel mutation.

extensive heterogeneity intrinsic to this disease; 56 different mutations have been detected in this series, and 16 had not been described previously. This comprehensive study depicts the genetic distribution of a large CMT series in the Mediterranean basin, and there are certain distinctive features compared with other geographic areas.

The CMT1A duplication is by far the most common mutation detected, and all patients were classified as demyelinating CMT; in fact, none had MMNCV >30 m/s. CMT1A accounts for 66.9% of the demyelinating forms, which is somewhat lower than other

series that report slightly more than 70%.¹⁸ Actually, these results are biased by the presence of 34 Gypsy patients affected by demyelinating CMT disease who harbored the previously described founder mutations associated with the Gypsy population as we have previously reported.^{11,19} These 34 Gypsy patients and 8 others of Caucasian ethnicity (4 with mutations in *PRX*, 2 in *SH3TC2*, and 2 in *FGD4*; table 4) comprise the 11.6% of demyelinating CMT with an AR inheritance (CMT4). The percentage of patients with AR or sporadic presentation is in fact greater than in other series⁶ and may reflect certain populational peculiarities,

Table 4 Genotype-phenotype correlation of the series of patients with autosomal recessive demyelinating CMT disease

Gene	Mutations	Patients/ families	Onset, y	Age at exam, y	Weakness	Sensory loss	Foot deformity, %	Scoliosis, %	Cranial nerves ^a	CMTNS; FDS	MMNCV, m/s; CMAP, mV ^b	SNAP, μ V
SH3TC2	p.R1109X (hom)	2/11	3.2	23.4	LL > UL; proximal 38%	Prominent; vibratory = pinprick; ataxia 100%	100	91	V-trigeminal neuralgia (5%); VIII (48%)	16.8; 3.7	24.6; 4.2	0.7; NR 52%
	p.R1109X/ p.C737_P738delinsX (hom)	5/3	4.1	20.3	LL > UL; proximal 40%	Same	100	100	VIII (40%)	15.6; 4.1	22.7; 4.8	0.3; NR 80%
HK1	p.R529Q (hom)	1/1	9	30	LL > UL; distal > proximal	Same	Yes	Yes	No	15; 2	18; 8.7	NR
	g.9712G>C (hom)	6/3	8	43	LL > UL; only distal	Same	Yes	Yes, mild	VIII	10; 2	28; 9.6	NR
NDRG1	p.R148X (hom)	2/2	4.8	24.2	LL > UL; proximal 33%	Prominent; vibratory > pinprick; ataxia 100%	100	50	VIII (33%)	14.1; 3	26.3; 5.1	1.9; NR 1.7%
	p.R148X (hom)	2/2	3.8	18.1	LL > UL; proximal 50%	Prominent; vibratory > pinprick; ataxia 100%	100	100	VIII (50%)	16.3; 3.1	16.7; 6.2	0.9; NR 50%
PRX	p.E167X/ p.R215QfsX8	3/1	2.7	25.7	LL > UL; only distal	Prominent; vibratory > pinprick; ataxia 100%	100	100	V-trigeminal neuralgia (33%)	22.7; 5.3	4.9; 1.2	NR 100%
	p.E113fsX3 (hom)	1/1	1	12	LL > UL; only distal	Prominent; vibratory > pinprick; ataxia	Yes	Yes	No	18; 3	5.8; 0.5	NR
FGD4^c	p.K630NfsX5 (hom)	2/1	2.5	32	LL > UL; only distal	Prominent; vibratory > pinprick; ataxia 100%	Yes	Yes	No	12; 3	11.5; 5.2	NR 100%

Abbreviations: CMAP = compound muscle action potential of the median nerve (normal values >9.3 mV); CMT = Charcot-Marie-Tooth; CMTNS = CMT neuropathy score; FDS = Functional Disability Scale; hom = homozygous; LL = lower limbs; MMNCV = median motor nerve conduction velocity (normal values in our laboratory >51.6 m/s); NR = not recordable (expressed in % of the patients); SNAP = sensory nerve action potential in median nerve (normal values >16.5 μ V); UL = upper limbs.

^aVIII nerve was considered affected when the patient reported relevant hypoacusis or the hearing loss was confirmed with audiometry.

^bNerve conduction studies of median nerve nearest to the moment of physical examination.

^cThe 2 patients with mutations in the *FGD4* gene had an early onset and moderate disability from infancy, but very slow progression thereafter.

as the Region of Valencia hosts a numerous Gypsy population (more than 50,000), and certain isolated areas have a high consanguinity rate.

Mutations in *GJBI* were the second most common genetic diagnosis after CMT1A, accounting for 12.8% of the CMT series. These patients were classified according to the MMNCV of the proband, but clinically all patients had a consistent phenotype that was not so much influenced by conduction velocities, as by sex.^{20,21} Only 5 patients (9%) had signs of CNS involvement (brisk reflexes and Babinski sign in 2 of them) with normal encephalic and spinal MRI. It is worth noting that in 2 of these patients after a long follow-up (>20 years), the pyramidal signs became less prominent as the neuropathy progressed, becoming overshadowed by the neuropathic signs. More than 300 mutations have been described in the *GJBI* gene, throughout the coding region and exceptionally, in the 5'-UTR (untranslated region). A very extensive family of our series was found to be carriers of a novel c.-540C>G mutation in this region. Its pathogenicity was demonstrated by a luciferase assay (data not shown).

Mutations in *MPZ* were detected in only 4.3% of the series; 9 were classified as demyelinating CMT and 10 as axonal CMT. In this case, there was important phenotypical variability, as has been reported in this gene.^{22,23} Except for one family, demyelinating patients were more severely affected, with earlier disease onset (first decade), prominent sensory loss, and moderate to severe disability with progression. One of these patients, carrier of the *MPZ* p.S121F mutation, developed a severe congenital hypomyelinating neuropathy.²⁴ Other genes were actually quite scarcely affected in our CMT1 series (*NEFL*, point mutations in *PMP22*, *PRX*, *SH3TC2*, and *FGD4*).

There is a great genetic diversity in axonal forms of CMT disease, as 25 different mutations were detected in 9 genes. The success rate of our series in these patients (62.6%) is one of the highest that has been published, probably because of the ample genetic screening that has been performed, and the high relative frequency of *GDAP1*. The genetic distribution in CMT2 shows that the 2 most frequent causes of axonal CMT disease were mutations in the *GDAP1* and *GJBI* genes, which combined accounted for 44.8% of patients who had axonal CMT disease. However, 37.4% of the patients with CMT2 remained undiagnosed, and this constitutes a great challenge for the near future.

Our series of 42 patients with mutations in the *GDAP1* gene is to date the most extensive one published and all of them presented neurophysiologic features of axonal CMT disease. Patients with apparently demyelinating or intermediate nerve conduction studies have been reported,^{25,26} but in our patients, the only ones with slow conduction velocities were those in which compound motor action potential was <0.5 mV, and

nerve conduction velocity was clearly normal if measured to nerves innervating proximal muscles. Although the neurophysiologic findings in these patients were unequivocally axonal, the pathology included both axonal degeneration and myelin abnormalities.^{10,27} Eighteen patients with recessive *GDAP1* mutations were detected, with an early disease onset and rapid progression, and were wheelchair-bound in the second or third decade in all cases except 2 (associated with p.L344R/p.Q163X compound heterozygote, and p.R282C/p.R282C homozygote genotypes) who had a relatively milder phenotype.²⁷ Twenty-four of 25 patients with dominant *GDAP1* mutations carried the p.R120W substitution, which is to date the most frequent dominant mutation detected in the *GDAP1* gene. Although this mutation has been described in families with different geographic origins,²⁸⁻³⁰ the *GDAP1* p.R120W probably has a founder effect in our population, and presents with a mild to moderate phenotype.¹⁰

Apart from the high prevalence of *GDAP1* mutations, the other notable factor in the axonal CMT series is the low number of cases with mutations in the *MFN2* gene (2.5%). *MFN2* has been identified as the most common gene in axonal CMT disease in many series,^{7,8} accounting consistently for 10% to 33%³¹⁻³³ of this CMT form, even in other Spanish Mediterranean areas.³⁴ Certain other European series have described even lower frequencies³⁵ than our own, suggesting that the distribution of *MFN2* mutations may be quite heterogeneous within Europe. The remaining mutations identified in axonal patients were even less frequent, including *MPZ*, *HSPB1*, *NEFL*, *GARS*, *HSPB8*, and *YARS* genes (15.3% of the CMT2 series).

The knowledge derived from thoroughly screened CMT series is essential to comprehend the global picture of this disease, as there may be relevant changes in the genetic distribution of different areas. A clear example of this is the relatively high prevalence of recessive forms and the predominance of *GDAP1* over *MFN2* in this clinical series. More information about the genetic distribution in other Spanish or Mediterranean areas is needed to discern whether this is only a local characteristic, or can be extrapolated to other areas.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Dr. Sivera: acquisition of data, analysis and interpretation, initial manuscript elaboration. Dr. Sevilla: study concept and design, initial manuscript elaboration. Dr. Vilchez: critical revision of the manuscript for important intellectual content. Ms. Martínez-Rubio: genetic studies, acquisition of data. Dr. Chumillas: nerve conduction studies, acquisition of data. Dr. Vázquez: acquisition of data, analysis and interpretation. Dr. Muelas and Dr. Bataller: critical revision of the manuscript for important intellectual content. Dr. Millán: genetic studies (CMT1A duplication), acquisition of data. Dr. Palau: study concept and design, critical revision of the manuscript for important intellectual content. Dr. Espinós: study concept and design, study supervision, genetic screening.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to Paula Sancho for helping to generate the database of CMT mutations in the Spanish population, to Susana Rovira for performing the study of the *GJB1* gene promoter region, and to Itziar Llopis for the sample management.

STUDY FUNDING

This collaborative joint project is awarded by IRDiRC and funded by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)–Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación within the framework of the National R+D+I Plan (grants IR11/TREAT-CMT, PI08/90857, PI08/0889, CP08/00053, PI12/00453, and PI12/0946), cofunded with FEDER funds, and the Generalitat Valenciana (grant Prometeo/2009/051). The Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) and the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) are initiatives from the ISCIII.

DISCLOSURE

R. Sivera reports no disclosures. T. Sevilla is funded by grants from the ISCIII (PI12/0946, PI08/0889) and IRDiRC (IR11/TREAT-CMT). J. Vilchez received research support from the CIBERNED. D. Martínez-Rubio, M. Chumillas, J. Vázquez, N. Muelas, L. Bataller, and J. Millán report no disclosures. F. Palau is funded by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (PI08/90857), the Generalitat Valenciana (Prometeo/2009/051), the IRDiRC (IR11/TREAT-CMT), and the CIBERER. C. Espinós is funded by a grant from the ISCIII (PI12/00453) and IRDiRC (IR11/TREAT-CMT). Dr. Espinós has a “Miguel Servet” contract funded by the ISCIII and the CIBERER (CP08/00053). Go to Neurology.org for full disclosures.

Received May 10, 2013. Accepted in final form July 30, 2013.

REFERENCES

1. Combarros O, Calleja J, Polo JM, Berciano J. Prevalence of hereditary motor and sensory neuropathy in Cantabria. *Acta Neurol Scand* 1987;75:9–12.
2. Fyfe C, Schofield I, Eglon G, Bailey G, Chinnery PF, Horvath R. Charcot-Marie-Tooth disease in Northern England. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012;83:572–573.
3. Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot Marie Tooth's disease. *Clin Genet* 1974;6:98–118.
4. Dyck PJ, Lambert EH. Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. I. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in hereditary polyneuropathies. *Arch Neurol* 1968;18:603–618.
5. Payreson D, Marchesi C. Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *Lancet Neurol* 2009;8:654–667.
6. Saporta AS, Sottile SL, Miller LJ, Feely SM, Siskind CE, Shy ME. Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol* 2011;69:22–33.
7. Murphy SM, Laura M, Fawcett K, et al. Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012;83:706–710.
8. 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.
9. Birouk N, Gouider R, Le Guem E, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with 17p11.2 duplication: clinical and electrophysiological phenotype study and factors influencing disease severity in 119 cases. *Brain* 1997;120:813–823.
10. Sivera R, Espinós C, Vilchez JJ, et al. Phenotypical features of the p.R120W mutation in the GDAP1 gene causing autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst* 2010;15:334–344.
11. Sevilla T, Martínez-Rubio D, Márquez C, et al. Genetics of the Charcot-Marie-Tooth disease in the Spanish Gypsy population: the hereditary motor and sensory neuropathy–Russe in depth. *Clin Genet* 2013;83:565–570.
12. Pitceathly R, Murphy SM, Cottenie E, et al. Genetic dysfunction of MT-ATP6 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 2012;79:1145–1154.
13. Kennerson ML, Yiu EM, Chuang DT, et al. A new locus for X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX6) is caused by mutations in the pyruvate dehydrogenase isoenzyme 3 (PDK3) gene. *Hum Mol Genet* 2013;22:1404–1416.
14. Xu W, Gu MM, Sun LH, et al. A nonsense mutation in DHTKD1 causes Charcot-Marie-Tooth disease type 2 in a large Chinese pedigree. *Am J Hum Genet* 2012;91:1088–1094.
15. Soong BW, Huang YH, Tsai PC, et al. Exome sequencing identifies GNB4 mutations as a cause of dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet* 2013;92:422–430.
16. Ylikallio E, Pöyhönen R, Zimon M, et al. Deficiency of the E3 ubiquitin ligase TRIM2 in early-onset axonal neuropathy. *Hum Mol Genet* 2013;22:2975–2983.
17. Lin KP, Soong BW, Yang CC, et al. The mutational spectrum in a cohort of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 among the Han Chinese in Taiwan. *PLoS One* 2011;6:e29393.
18. Nelis E, Van Broeckhoven C, De Jonghe P, et al. Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a European collaborative study. *Eur J Hum Genet* 1996;4:25–33.
19. Claramunt R, Sevilla T, Lupo V, et al. The p.R1109X mutation in SH3TC2 gene is predominant in Spanish Gypsies with Charcot-Marie-Tooth disease type 4. *Clin Genet* 2007;71:343–349.
20. Shy ME, Siskind C, Swan ER, et al. CMT1X phenotypes represent loss of GJB1 gene function. *Neurology* 2007;68:849–855.
21. Siskind CE, Murphy SM, Ovens R, Polke J, Reilly MM, Shy ME. Phenotype expression in women with CMT1X. *J Peripher Nerv Syst* 2011;16:102–107.
22. Warner L, Hiltz M, Appel S, et al. Clinical phenotypes of different MPZ (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth type 1B, Dejerine-Sottas, and congenital hypomyelination. *Neuron* 1996;17:451–460.
23. Shy ME, Jani A, Krajewski K, et al. Phenotypic clustering in MPZ mutations. *Brain* 2004;127:371–384.
24. Sevilla T, Lupo V, Sivera R, et al. Congenital hypomyelinating neuropathy due to a novel MPZ mutation. *J Peripher Nerv Syst* 2011;16:347–352.
25. Baxter RV, Ben Othmane K, Rochelle JM, et al. Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet* 2002;30:21–22.
26. Senderek J, Bergmann C, Ramaekers VT, et al. Mutations in the ganglioside-induced-differentiation-associated protein-1 (GDAP1) gene in intermediate type autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain* 2003;126:642–649.
27. Sevilla T, Jaijo T, Nauffal D, et al. Vocal cord paresis and diaphragmatic dysfunction are severe and frequent symptoms of GDAP1-associated neuropathy. *Brain* 2008;131:3051–3061.

28. Claramunt R, Pedrola L, Sevilla T, et al. Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J Med Genet* 2005;42:358–365.
29. Zimoń M, Baets J, Fabrizi GM, Jaakkola E, et al. Dominant GDAP1 mutations cause predominantly mild CMT phenotypes. *Neurology* 2011;77:540–548.
30. Ammar N, Nelis E, Merlini L, Barisic N, et al. Identification of novel GDAP mutations causing autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscul Disord* 2003;13:720–728.
31. Verhoeven K, Claeys KG, Züchner S, et al. MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain* 2006;129:2093–2102.
32. Calvo J, Funalot B, Ouvrier RA, et al. Genotype-phenotype correlations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2 caused by mitofusin 2 mutations. *Arch Neurol* 2009; 66:1511–1516.
33. Auranen M, Ylikallio E, Toppila J, Somer M, Kiuru-Enari S, Tyynismaa H. Dominant GDAP1 founder mutations is a common cause of axonal Charcot-Marie-Tooth disease in Finland. *Neurogenetics* 2013;14:123–132.
34. Casanovas C, Banchs I, Cassereau J, et al. Phenotypic spectrum of MFN2 mutations in the Spanish population. *J Med Genet* 2010;47:249–256.
35. Braathen GJ. Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 2012;126:1–22.
36. Lupo V, Galindo MI, Martínez-Rubio D, et al. Missense mutations in the SH3TC2 protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4C affect its localization in the plasma membrane and endocytic pathway. *Hum Mol Genet* 2009; 18:4603–4614.

b. Artículo II:

Phenotypical features of the p.R120W mutation in the GDAP1 gene causing autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease.

Sivera R, Espinós C, Vílchez JJ, Mas F, Martínez-Rubio D, Chumillas MJ, Mayordomo F, Muelas N, Bataller L, Palau F, Sevilla T.

J Peripher Nerv Syst. 2010 Dec;15(4):334-44.

RESEARCH REPORT

Phenotypical features of the p.R120W mutation in the *GDAP1* gene causing autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease

Rafael Sivera¹, Carmen Espinós², Juan J. Vilchez^{1,3}, Fernando Mas^{3,4}, Dolores Martínez-Rubio^{2,5}, María José Chumillas^{3,6}, Fernando Mayordomo³, Nuria Muelas^{1,3}, Luis Bataller^{1,3}, Francesc Palau^{2,5}, and Teresa Sevilla^{1,3}

¹Department of Neurology, University Hospital Universitari La Fe, Valencia; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Valencia; ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Valencia; ⁴Department of Radiology, University Hospital Universitari La Fe, Valencia; ⁵Laboratory of Genetics and Molecular Medicine, Instituto de Biomedicina de Valencia-CSIC, Valencia; and ⁶Clinical Neurophysiology, University Hospital Universitari La Fe, Valencia, Spain

Abstract Mutations in the *ganglioside-induced-differentiation-associated protein 1* gene (*GDAP1*) can cause Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease with demyelinating (CMT4A) or axonal forms (CMT2K and ARCMT2K). Most of these mutations present a recessive inheritance, but few autosomal dominant *GDAP1* mutations have also been reported. We performed a *GDAP1* gene screening in a clinically well-characterized series of 81 index cases with axonal CMT neuropathy, identifying 17 patients belonging to 4 unrelated families in whom the heterozygous p.R120W was found to be the only disease-causing mutation. The main objective was to fully characterize the neuropathy caused by this mutation. The clinical picture included a mild–moderate phenotype with onset around adolescence, but great variability. Consistently, ankle dorsiflexion and plantar flexion were impaired to a similar degree. Nerve conduction studies revealed an axonal neuropathy. Muscle magnetic resonance imaging studies demonstrated selective involvement of intrinsic foot muscles in all patients and a uniform pattern of fatty infiltration in the calf, with distal and superficial posterior predominance. Pathological abnormalities included depletion of myelinated fibers, regenerative clusters and features of axonal degeneration with mitochondrial aggregates. Our findings highlight the relevance of dominantly transmitted p.R120W *GDAP1* gene mutations which can cause an axonal CMT with a wide clinical profile.

Key words: ADCMT, Charcot-Marie-Tooth disease, CMT2K, *GDAP1* mutations

Introduction

Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) is a genetically heterogeneous group of inherited motor and sensory neuropathies. Molecular studies have shown

extensive genetic heterogeneity in CMT neuropathies with an ever-growing list of causative mutations and loci (*Pareyson and Marchesi, 2009*). Mutations in the *ganglioside-induced-differentiation-associated protein 1* (*GDAP1*; MIM 606598) gene 8q21 have been reported in CMT patients with demyelinating (CMT4A; MIM 214400) (*Baxter et al., 2002*) and axonal forms (CMT2K and ARCMT2K; MIM 607831) of the disease (*Cuesta et al., 2002*). Inheritance in most CMT

Address correspondence to: Dr. Teresa Sevilla, Department of Neurology, Hospital Universitari La Fe, Avda. Campanar, 21, 46009 Valencia, Spain. Tel: +3496-3862761; Fax: +3496-1973290; E-mail: sevilla_ter@gva.es

causative *GDAP1* mutations is autosomal recessive (Boerkoel et al., 2003; Sevilla et al., 2003) characterized by a severe phenotype with early disease onset and rapid progression to important disability in the second or third decade. In recent reports, certain mutations have been shown to segregate as an autosomal dominant (AD) trait with a later disease onset and a mild phenotype (Claramunt et al., 2005; Chung et al., 2008a; Cassereau et al., 2009), the p.R120W missense mutation being the most prevalent one (Claramunt et al., 2005; Cavallaro et al., 2009).

In a previous study we reported a series of autosomal recessive or sporadic *GDAP1*-related neuropathies (Sevilla et al., 2008). The extension of the screening for mutations in the *GDAP1* gene to AD families with axonal CMT has allowed us to recognize 17 patients belonging to 4 unrelated families in whom the only detected mutation was *GDAP1* p.R120W in heterozygosis, 2 of them were only known by history and genetics. The main objective of the present study was to characterize clinically, electrophysiologically and pathologically this form of CMT neuropathy, designated CMT2K. Additionally, a systematic magnetic resonance imaging (MRI) investigation was performed in these patients so as to identify specific patterns of muscle involvement, as has been described in other types of CMT disease (Gallardo et al., 2006; Chung et al., 2008b).

Material and Methods

Study subjects

We investigated a clinically well-characterized series of 81 patients who presented with axonal CMT. A mutational screening of the more frequent axonal CMT genes, *MFN2*, *GJB1*, *GDAP1*, and *MPZ*, and some of the rarer ones, *NEFL*, *HSP22*, and *HSP27*, has been carried out. Causative mutations have been recognized in 34 probands and in 4 of them, the *GDAP1* p.R120W mutation was the only one present. We have identified 17 patients belonging to these four families with the *GDAP1* p.R120W (c.358C>T) mutation in which disease was inherited as an AD trait. The pedigrees are displayed in Fig. 1; family B was previously reported (Claramunt et al., 2005). The families were unrelated, and do not originate from the same Spanish region. All protocols performed in this study complied with the ethics guidelines of the institutions involved. All patients and relatives were aware of the investigative nature of the studies and gave their consent.

Genetic analyses

Blood samples were drawn from the patients and relatives after informed consent and in accordance

with the Helsinki declaration. Genomic DNA was obtained by standard methods from peripheral white blood cells. Mutation analysis of the *GDAP1* gene was performed by amplification of the six exons and their intronic flanking sequences using primers previously described (Cuesta et al., 2002). The polymerase chain reaction (PCR) products were analyzed by DHPLC (Denaturing High Liquid Chromatography, Transgenomic WAVE® System) and the anomalous patterns were investigated by automated sequencing (ABI Prism 3130xl, Applied Biosystems, Foster, CA). When possible, segregation analyses were performed.

Linkage analysis was carried out under the assumption of AD inheritance, full penetrance, and equal frequency of marker alleles. Pairwise LOD scores were calculated using the MLINK program version 5.1 of the FASTLINK package 2.1 (Lathrop and Laouel, 1984). Haplotype analyses at the *GDAP1* locus was carried out on the basis of cen_8S279-D8S286 – D8S551-c.507T>G – D8S1474-D8S1829-D8S84.tel as previously described (Claramunt et al., 2005).

Clinical and electrophysiological assessments

All probands and individuals at risk were examined except patients B-II2 and B-III2. The clinical assessment included strength, muscle atrophy, sensory loss, reflexes, foot deformities as well as a general and neurologic examination. Muscle strength was graded using the standard Medical Research Council (MRC) scale. CMT neuropathy score (CMTNS) was applied to determine neurological impairment: mild (CMTNS ≤ 10 points), moderate (CMTNS 11–20), and severe (CMTNS 21–36) (Shy et al., 2005). The functional disability scale (FDS) was used to measure the disability status (Birouk et al., 1997). Data from family B were updated except for patients B-II2 and B-III2, who were not available for this study.

Electrophysiological studies were performed in 14 of the patients following the same protocol that was described previously (Sevilla et al., 2003).

Magnetic resonance imaging

MRI was performed on the feet and distal legs of eight patients in a supine position using a 1.5-T MR platform (Siemens Avanto, Erlangen, Germany). The following protocol was used in all patients: axial and coronal T1-weighted TSE (turbo spin echo), Short T1 Inversion Recovery (STIR), and T1 fat-saturation images of both legs and feet before and after Gadolinium-DTPA (Magnevist, Schering, Germany) administration were obtained. Only one imaging plane was acquired in each region after contrast administration.

The four classic anatomical compartments were used to evaluate calf muscles: anterior compartment

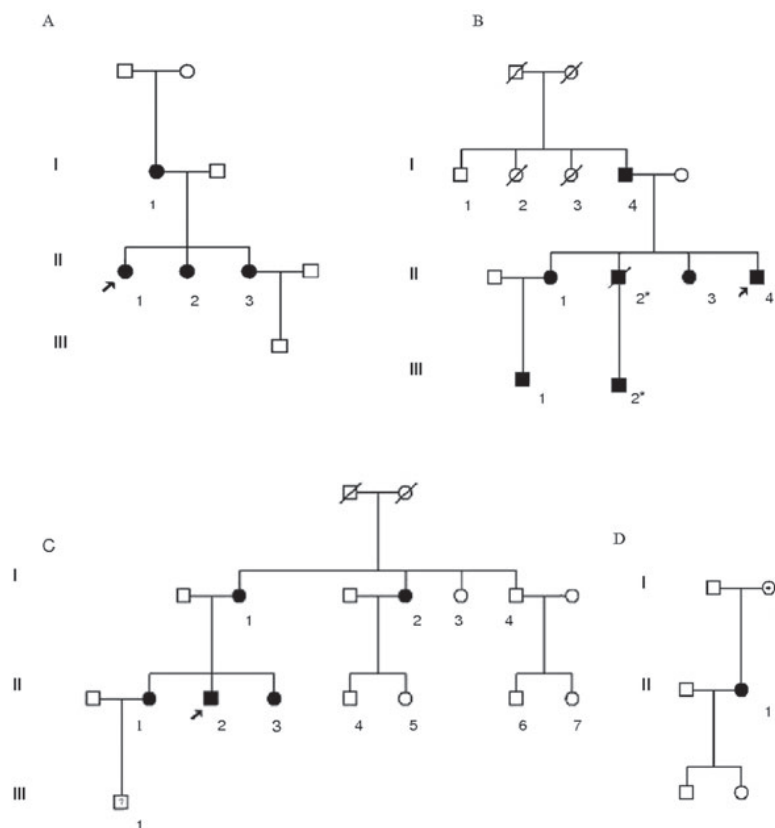


Figure 1. Pedigrees of the four affected families. Squares = males, circles = females, shaded symbols = affected, dotted circle = affected by history. Family B has been previously reported (Claramunt et al., 2005) and includes two individuals (*) who have not been clinically assessed in this moment.

(tibialis anterior, extensor hallucis longus, and extensor digitorum longus), lateral compartment (peronei longus and brevis), superficial posterior compartment (soleus and gastrocnemius), and deep posterior compartment (tibialis posterior, flexor digitorum longus, and flexor hallucis longus). In axial MR images of lower limbs, fatty infiltration was graded from 0 to 4 as follows: 0, no fat signal in muscle; 1, some fatty streaks; 2, fat occupying a minor part of muscle; 3, similar amount of fat and muscle tissue; 4, fat occupying the greater part of muscle (Chung et al., 2008b).

Nerve biopsies

Sural nerve biopsy was performed in two cases (patients A-II1 and C-II2) when they were 47 and 31 years old, respectively, and compared to a 27-year-old multi-organ donor without neuropathic or systemic disease history. Semi-thin sections stained with toluidine blue were prepared for evaluation under a light

microscope following the same protocol as described previously (Sevilla et al., 2003). Morphometry of myelinated fibers was performed on high-resolution micrographic images obtained with a Polaroid DMC digital camera and analyzed by means of Scion image analysis software (<http://www.scioncorp.com>). Ultra-thin cut samples were contrasted with uranyl acetate and lead citrate for ultrastructural study.

Results

Genetic analyses

Seventeen patients from four unrelated families carrying the *GDAP1* p.R120W mutation in a heterozygous state were identified. No other pathogenic mutations were detected in other exons or in their flanking intron regions. AD inheritance was confirmed by co-segregation of the *GDAP1* p.R120W mutation

with disease in families A, B, and C (Fig. 1). In family D, only sample from the proposita was available and therefore a segregation analysis was not possible. Next, we performed a linkage analysis for the *GDAP1* p.R120W mutation in the three multiplex families. The obtained cumulative maximum LOD score (Z_{max}) was 2.83 ($\theta = 0.00$). This $Z_{max} \sim 3$ reinforces that the *GDAP1* p.R120W presents an AD inheritance. We have constructed haplotypes by analysis of six flanking microsatellite markers, which span ~ 2.83 Mb around the *GDAP1* locus, and one intragenic single nucleotide polymorphism (SNP). All the chromosomes carrying the *GDAP1* p.R120W mutation share the same haplotype 3-5-G-5-6-6 on the basis of *cen_D8S286-D8S551-c.507T>G-D8S1474-D8S1829-D8S84_tel*, suggesting a common origin.

Clinical findings

The clinical characteristics of 15 patients from the four families with the p.R120W missense mutation in the *GDAP1* gene are summarized in Table 1. The age in which patients experienced the first symptom ranged between 9 and 65 years (median 17 years), with disease duration between 5 and 48 years. There was no delay in the acquisition of motor milestones. Four patients (A-II2, A-II3, B-III1, and C-I2) aged 20, 38, 33, and 72 did not complain of any symptom but clinical examination revealed minor signs. Patient A-II2 had mild weakness in toe extension, hyporreflexia and hypoesthesia in lower limbs, patient A-II3 absent ankle reflexes and distal hypoesthesia, patient B-III1 pes cavus, and patient C-I2 absent knee and ankle jerks.

The disease started in the distal lower limbs. Only two patients had mild proximal involvement in the lower limbs (A-I1 and D-II1), being quite disabling in one case. All symptomatic cases presented weakness in ankle plantar flexion (EHL) and toe extension. Weakness in ankle dorsiflexors was present to the same degree as plantar flexors in most symptomatic patients, being the impairment of heel and toe walk quite analogous. Distal upper limb weakness appeared later in the course of the disease and involved the intrinsic hand muscles predominately. At the time of the examination, 12 patients had motor deficits in distal lower limbs, seven patients in both the distal lower and upper limbs. In one patient (C-II2), the distribution of atrophy and weakness in the lower limbs was asymmetric. All patients except two had preserved reflexes in the upper limbs, but hypo/arreflexia in lower limbs and different degrees of lower limb distal atrophy. Foot deformities, including pes cavus and Achilles tendon shortening, were also very common. Sensory loss proportional to the motor deficit was present in all symptomatic patients, especially pinprick and vibration

Table 1. Clinical data of the series.

Patient	Onset (years)/Age at exam	CMTNS	Proximal LL	Ankle DF	Ankle PF	TE	IHM	Heel/toe walk	UL DTR	Knee DTR	Ankle DTR	Pes cavus	Pinprick sensory loss	Vibratory sensory loss	FDS
A-I1	>40/67	21	4	2	2	0	4	I/I	+	-	-	Moderate	Moderate	Ankle	5
A-II1	9/43	14	5	3	3	0	4+	I/I	++	+	-	Moderate	Knee/elbow	Ankle	3
A-II2	A/40	5	5	5	5	4+	5	N/D	++	++	+	Mild	Knee/elbow	Ankle	0
A-II3	35/38	7	5	5	5	2	4	N/N	++	++	-	Mild	Toes	None	3
B-I4	65/80	11*	5	2	2	2	4	I/I	-	-	-	No	Ankle	Toes	0
B-II1	15/52	10	5	4	4	3	4	I/I	++	++	-	Mild	Ankle	Ankle	4
B-III1	A/20	0	5	5	5	5	5	N/N	++	++	++	Mild	Ankle	None	0
B-II2	16/40	4	5	4	4	4	5	D/D	++	++	-	Mild	Ankle	None	1
B-II4	17/38	12	5	4	4	3	4	D/D	++	++	-	Moderate	Ankle	Toes	3
C-I1	18/62	9	5	5	5	4	3	D/D	++	++	-	Moderate	Ankle/finger	Ankle	2
C-I1	20/33	6	5	5	5	5	5	D/N	++	++	-	Mild	Ankle	None	1
C-II2	14/30	15	5	3	2 ^R /4 ^L	1	4	I/I	++	++	-	Moderate	Ankle	Ankle	2
C-II3	12/24	7	5	4	4	3	5	D/D	++	++	-	Moderate	Ankle	None	2
C-I2	A/72	0*	5	5	5	5	5	N/N	++	++	-	No	None	None	0
D-II1	25/75	25	4+	0	0	0	4	I/I	-	-	-	Mild	Knee/finger	Ankle	5

A, asymptomatic; D, difficulty; DF, dorsiflexion; DTR, deep tendon reflexes; I, impossible; IHM, intrinsic hand muscles; L, left; LL, lower limbs; N, normal; PF, plantar flexion; R, right; TE, toe extension; UL, upper limbs.
- represents absent reflex, + mildly depressed reflex, and ++ normal reflex.
*Patients in which only the clinical parameters were used to calculate the Charcot-Marie-Tooth neuropathy score (no electrophysiological data available).

in distal lower limbs. Patient A-II2 received chemotherapy for breast cancer 10 years ago, but during a 24-year follow-up the disability has followed a progressive course.

The CMTNS scores in the series reflected the wide phenotypic spectrum, ranging from 0 to 25. There were only two patients who were catalogued in the CMTNS severe category, both of them had a long disease evolution. Nine patients (60%) were in the mild category and four in the moderate. All patients, to date, have an FDS equal or less than four except two patients, patient A-I1 who is mostly wheelchair bound and patient D-II1 who needs a cane or crutches to walk. Disease progression was slow in the majority of cases but two patients (A-I1 and B-I4) had onset after 40, but developed a relevant functional impairment.

Electrophysiological studies

Table 2 summarizes the nerve conduction and electromyography studies performed. Motor nerve conduction velocities, distal latencies, and F-waves were normal in all tested nerves (median MNCV >54 m/s in all patients). Ulnar and median CMAP were reduced only in two individuals, while peroneal CMAP was reduced in most affected individuals. Sensory nerve conduction studies showed a reduction of SNAP in all tested patients, but conduction velocities and distal latencies were preserved in nerves with SNAP >0.5 μ V. In the whole series, even in asymptomatic patients, needle electromyography revealed motor unit action potentials (MUAPs) increased in amplitude, duration, and polyphasic incidence. Positive sharp waves and fibrillation potentials were not present.

MRI studies

All patients had detectable abnormalities in the MRI consisting of fatty infiltration and/or muscle edema (Table 2).

Intrinsic musculature of both feet showed consistent and bilateral fatty infiltration of the foot muscles in all patients, even in asymptomatic ones (Fig. 2A). The changes were present in all intrinsic foot muscles and were more pronounced in severely affected patients. All patients had evidence of varying degrees of fatty substitution in the muscles of the calf in concordance with the severity of the phenotype. In any case there was a common pattern: a predominance of fatty substitution distally and in the posterior compartment over the anterolateral one.

Mild cases showed distinct abnormalities in the distal muscles of the calf; high signal intensity on T1-weighted and STIR images, corresponding with fatty substitution and muscle edema, respectively. The first muscle affected and the one in which the findings were more prominent was the gastrocnemius, and to

a slightly lesser degree the soleus (Fig. 2B); the rest of the muscles in the calf were completely preserved in most mild cases.

In more severe cases the fatty substitution involved all muscle compartments of the calf and muscle edema was no longer present. The posterior compartment was always affected to a greater degree than the anterolateral one with a mean grade of 3.1 vs. 1.5 ($p < 0.05$) (Fig. 2C). MRI of the thigh was performed in only two patients (A-II1 and D-II1) with a moderate–severe phenotype, existing fatty substitution distally in all the muscles.

Pathologic findings

The two sural nerve biopsies performed revealed similar pathological findings. Semi-thin sections showed a pronounced depletion of myelinated fibers in both nerves (fiber density was 3202/mm² in patient A-II1, 5863/mm² in patient C-II2, and 9095/mm² in the control subject). The histograms representing myelinated fiber size were “shifted to the left,” showing a marked reduction of large-diameter fibers, especially in patient A-II1 (fibers >6 μ V = 12.3% in A-II1, 31.5% in C-II2, and 41.7% in control). Morphometric data also revealed a considerable proportion of thinly myelinated fibers with a *g*-ratio greater than 0.7 (18.2% in A-II1, 20.9% in C-II2, and 5% in control).

Rather frequent regenerative clusters and occasional onion bulb formations were also present (Fig. 3A). In detailed electron-microscope views, onion bulbs were made up of concentric layers of Schwann cell processes adopting a crescent shape and enclosing a central core composed of a regenerative cluster, or less frequently a hypomyelinated or normally myelinated fiber (Fig. 3B). These formations had a limited number of folds (pseudo-bulbs) not reaching the size observed in CMT1A. The regenerative clusters were composed of a group of small myelinated fibers, a large bundle of unmyelinated axons, or a combination of the two (Fig. 3E).

On high magnification, myelin compaction always appeared normal. However, axons often presented degenerative features consisting of axolemma retraction with partial or total detachment (Fig. 3C), aggregation of normal and abnormal mitochondria mixed with empty vacuoles, and cytoskeleton dissolution with early disappearance of microtubules (Fig. 3D). Degeneration involved both myelinated and unmyelinated axons with preference for those included in regenerative clusters (Fig. 3F).

Discussion

AD *GDAP1* mutations are exceedingly rare in most published CMT series. Here we present the

Table 2. Nerve conduction and MRI data.

Patient	Nerve conduction studies														EMG. neurogenic changes	MRI																			
	Median			Ulnar			Peroneal			Median			Sural			IFM	Soleus	Gastrocnemius	DPC	AC	LC	Thigh													
	CMAP (mV)	MCV (m/s)	SNAP (μV)	CMAP (mV)	MCV (m/s)	SNAP (μV)	CMAP (mV)	MCV (m/s)	SNAP (μV)	CMAP (mV)	MCV (m/s)	SNAP (μV)	CMAP (mV)	MCV (m/s)									SNAP (μV)												
A-I1	9.4	54.8	6.1	53.5	0.6	40.3	1.6	36.3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR								
A-I1	7.5	69	NP	NP	1.3	48	4	44	3	29	4	44	3	29	4	44	3	29	4	44	3	29	4	44	3	29	4	44	3	29					
A-I2	9.5	60	12	60.3	5.4	42	12	57.1	1.8	50	Yes	57.1	1.8	50	Yes	57.1	1.8	50	Yes	57.1	1.8	50	Yes	57.1	1.8	50	Yes	57.1	1.8	50	Yes				
A-I3	11.5	60	15.7	64.9	7.3	50.8	10	54.7	9.1	NP	Yes	54.7	9.1	NP	Yes	54.7	9.1	NP	Yes	54.7	9.1	NP	Yes	54.7	9.1	NP	Yes	54.7	9.1	NP	Yes				
B-II1	11.2	69.1	11.7	67.9	4	53.7	6.5	53.3	6.2	55.6	Yes	53.3	6.2	55.6	Yes	53.3	6.2	55.6	Yes	53.3	6.2	55.6	Yes	53.3	6.2	55.6	Yes	53.3	6.2	55.6	Yes				
B-II1	17.2	61.2	20.6	69.3	11.9	45	24	50	15	65.9	Yes	50	15	65.9	Yes	50	15	65.9	Yes	50	15	65.9	Yes	50	15	65.9	Yes	50	15	65.9	Yes				
B-I2	12.1	60.3	14.4	52.3	4	43.8	26	60	9.9	48.2	Yes	60	9.9	48.2	Yes	60	9.9	48.2	Yes	60	9.9	48.2	Yes	60	9.9	48.2	Yes	60	9.9	48.2	Yes				
B-I3	9.1	59	NP	NP	1.8	47	8.5	49	0.5	41	Yes	47	8.5	49	0.5	41	Yes	47	8.5	49	0.5	41	Yes	47	8.5	49	0.5	41	Yes	47	8.5	49	0.5	41	
B-I4	11.7	56.5	13.6	57.5	2.1	40.8	2.8	47.4	6.6	33.3	Yes	40.8	2.8	47.4	6.6	33.3	Yes	40.8	2.8	47.4	6.6	33.3	Yes	40.8	2.8	47.4	6.6	33.3	Yes	40.8	2.8	47.4	6.6	33.3	
C-I1	NP	NP	NP	NP	7.9	42.5	NR	NR	1.1	37.6	NP	NR	NR	1.1	37.6	NP	NR	NR	1.1	37.6	NP	NR	NR	1.1	37.6	NP	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
C-I1	18.5	57	NP	NP	15	39	4.5	NP	0.7	NR	Yes	NP	0.7	NR	Yes	NP	0.7	NR	Yes	NP	0.7	NR	Yes	NP	0.7	NR	Yes	NP	0.7	NR	Yes	NP	0.7	NR	Yes
C-I2	15	56.3	13.7	59.2	0.5	NR	5.8	40.7	4.5	38.2	Yes	59.2	4.5	38.2	Yes	59.2	4.5	38.2	Yes	59.2	4.5	38.2	Yes	59.2	4.5	38.2	Yes	59.2	4.5	38.2	Yes	59.2	4.5	38.2	Yes
C-I3	8	56	NP	NP	5.2	45	1.6	NR	NR	NR	NP	NR	NR	NR	NP	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NP	NR	NR	NR	NR	NR	NP	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
D-I1	6.6	53.8	5.6	50	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Yes	50	NR	NR	Yes	50	NR	NR	Yes	50	NR	NR	Yes	50	NR	NR	Yes	50	NR	NR	Yes	50	NR	NR	Yes

AC, anterior compartment; CMAP, compound muscle action potential; DPC, deep posterior compartment; IFM, intrinsic foot muscles; LC, lateral compartment; MCV, motor nerve conduction velocity; MRI, magnetic resonance imaging; NP, not performed; NR, no response; SCV, sensory conduction velocity; SNAP, compound sensory nerve action potential. 0 = no fat signal in muscle, 1 = some fatty streaks, 2 = fat occupying a minor part of muscle, 3 = similar amount of fat and muscle tissue, 4 = fat occupying the greater part of muscle.

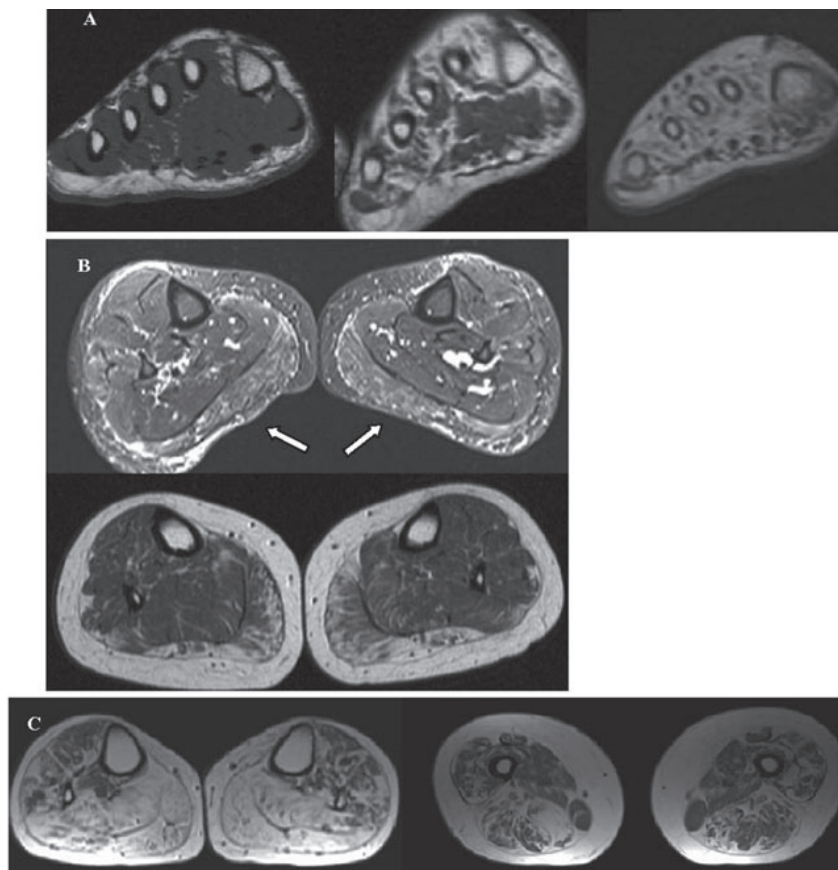


Figure 2. Magnetic resonance imaging of the foot and calf muscles in mild and severe phenotypes. (A) Axial T1 weighted images showing fatty infiltration in the intrinsic foot muscles from left to right of a control subject, an asymptomatic patient (patient A-II2) and a moderately severe patient (patient C-II2). (B) Axial STIR (above) and T1 weighted (below) images of the calf of patients with a mild phenotype (patient C-I2 and B-II1, respectively). There is muscle edema and fatty infiltration in the superficial posterior compartment of the calf (arrows). (C) Axial T1 weighted images of the calf (left) and thigh (right) of patients with a severe phenotype (patient A-I1 and D-II1, respectively) showing fatty substitution in all the muscle compartments of the calf (posterior > anterolateral) and distal thigh.

clinical records belonging to 15 carriers of the *GDAP1* p.R120W mutation from four families. They represent 5% of our series of axonal CMT index patients. Whether this indicates a genetic drift in our population or an under-representation in other series is a pending question.

It is also noteworthy that all our families shared a common haplotype, which is probably the consequence of a founder effect, like other reported *GDAP1* mutations (Claramunt et al., 2005). This mutation has also been detected in two unrelated cases in Belgium and Italy (Ammar et al., 2003; Cavallaro et al., 2009). It would be very interesting to construct haplotypes in

these two families so as to ascertain if all of them share the same haplotype and, therefore, a unique origin could be postulated for the *GDAP1* p.R120W mutation.

The clinical picture comprehends a mild–moderate phenotype with great clinical variability. Disease onset varied, and duration is not clearly related to phenotypic severity. The identification of four practically asymptomatic mutation carriers, one of whom was already of age 72, suggests that the p.R120W mutation may have incomplete penetrance. Weakness was first manifested distally in the lower limbs with the peculiarity that ankle dorsi and plantar flexors were impaired to similar degrees, as were tiptoe and heel walking.

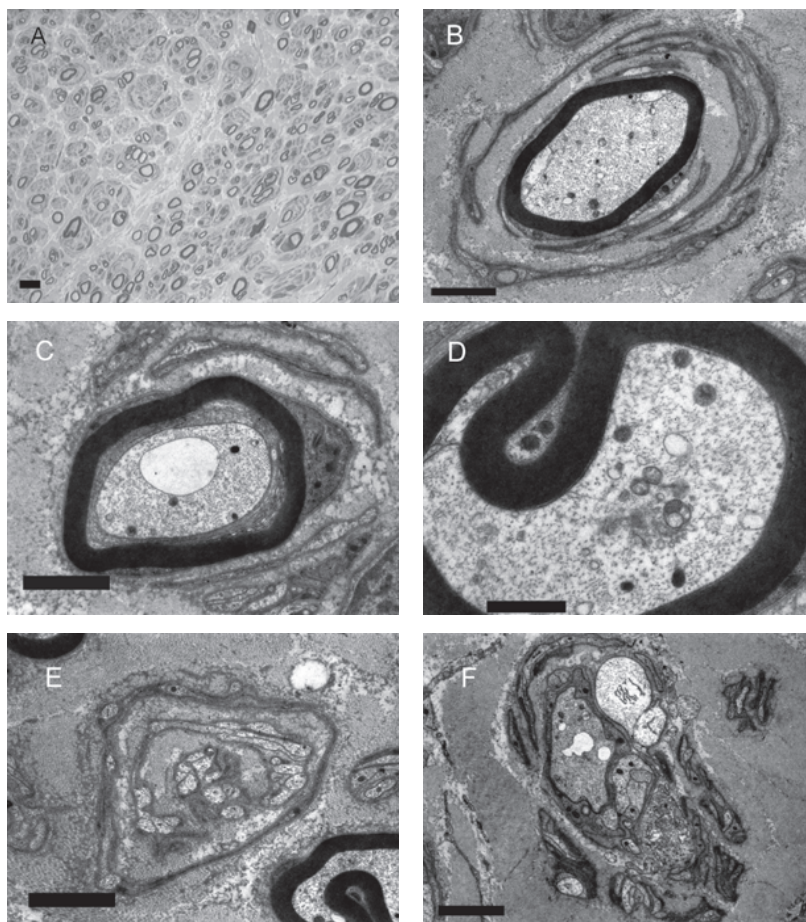


Figure 3. Semithin and electron microscope views of the sural nerve biopsy. (A) Semithin transverse section of patient A-I11 showing a pronounced depletion of large myelinated fibers. Note as well thinly myelinated fibers, regenerative clusters, and few onion bulb formations. Plates B–F display distinct electron microscope views. (B) Onion bulb formation surrounding a thinly myelinated axon. (C) Axonal atrophy with axolemma detachment from myelin sheath. (D) Normally myelinated axon with focal accumulates of abnormal mitochondria and paucity of microtubules. (E) Bulb formation encircling a regenerating cluster of unmyelinated axons. (F) Regenerative cluster composed of a bundle of axons, one of them with a tiny myelin sheath, showing axoplasmic degenerative features. Bar = 10 mm in B, 2 mm in C, D, F, G, 1 mm in E.

This picture contrasts with the typical CMT1A (MIM 118220) patients, which usually begin with foot drop due to weakness of ankle dorsiflexors (Birouk et al., 1997), being more similar to patients with late onset *MFN2* (*mitofusin 2*) mutations (CMT2A; MIM 609260) in which there may exist a predominance of ankle plantar flexion weakness and greater difficulty in toe than in heel walking (Chung et al., 2008b).

Comparing the distribution of motor weakness in AD patients to patients carrying recessive *GDAP1* mutations is quite a difficult task due to the severity

and the rapid disease progression in the latter. In our series with recessive *GDAP1* mutations (Sevilla et al., 2008), characterization of the distal distribution weakness has been possible only in two (in one data not published) who had a slightly more indolent course. In these patients the motor weakness in ankle plantar and dorsiflexion was analogous, as was the impairment of toe and heel walking, findings quite similar to the dominant forms. None of the dominant patients had stridor or voice hoarseness, a common characteristic in recessive forms (Azzedine et al., 2003; Senderek

et al., 2003; Moroni et al., 2009). Proximal muscles were involved only late in the course of the disease in some patients, causing impairment of independent ambulation.

Nerve conduction studies in our series revealed motor velocities in the axonal range. Needle electromyography exposed giant motor units even in asymptomatic patients. This finding was very consistent in our series and has been already described in another family with the p.C240Y dominantly inherited mutation in *GDAP1* (Cassereau et al., 2009). The physiopathology of this remains unclear, but is consistent with the slowly progressive nature of the disease, permitting significant collateral sprouting and hence motor unit remodeling.

The pathologic study of the two sural nerve biopsies performed was quite homogeneous and very similar to those described in the recessive *GDAP1* mutations, although the fiber loss was clearly more prominent in the latter (Sevilla et al., 2003). The main abnormalities were loss of myelinated fibers and axonal degenerative features. The presence of regenerative clusters was prominent, and may represent a true reparative process of sprouting after axonal damage, or an inadequate development of myelinated axons. Whatever be the origin, these sprouted fibers could account for the high proportion of hypomyelinated fibers reported in the morphometric data. The presence of the small onion bulb formations is not yet explained, but probably do not correspond to a purely demyelinating phenomenon, as the nerve conduction velocities are clearly in the axonal range. These findings have also been reported in other axonal neuropathies like those related to *MFN2* mutations (Chung et al., 2006).

In our series, the pattern of muscle abnormalities in MRI was quite homogeneous and concordant with disease severity. The main findings described were fatty substitution of affected muscles, atrophy, and occasionally edema in subacute muscle denervation (Fleckenstein et al., 1993; May et al., 2000). These were consistent and present to a greater or lesser degree in all tested patients, even in patients like C-12 who was asymptomatic, and had no abnormalities in examination except absent lower limb reflexes. The first affected muscles were the intrinsic foot and distal calf muscles, with a clear predominance of the posterior over the anterolateral compartment. Fatty infiltration in the calf sequentially extended from gastrocnemius to soleus muscles and in time to the anterolateral compartment muscles (Table 2, Fig. 2B and 2C). This pattern is quite similar to that reported in late-onset CMT2A (Chung et al., 2008b) but in this type the soleus muscle in the superficial posterior compartment was the earliest and most severely affected

muscle. On the other hand, the pattern is quite different to that in CMT1A (Gallardo et al., 2006), where there is a predominance of fatty substitution in the anterolateral compartment of the calf. These differences in the pattern of lower leg muscle involvement in diverse types of CMT are one of the more solid reasons to consider MRI as an important tool for phenotypic CMT characterization. In any case further studies are needed to confirm if the preferential involvement of the posterior superficial compartment beginning with the gastrocnemius is specific for *GDAP1* mutations.

Most of the *GDAP1* mutations co-segregate with CMT in an autosomal recessive manner, whereas AD *GDAP1* mutations are rare. Mutations causative of an axonal CMT neuropathy with both dominant and recessive patterns of inheritance have been reported in three other genes: *NEFL* (Abe et al., 2009; Yum et al., 2009), *HSP27* (Houlden et al., 2009), and *MFN2* (Nicholson et al., 2008; Calvo et al., 2009). To date, six *GDAP1* missense mutations with AD inheritance pattern have been reported: p.R120W, p.T157P, p.Q218E, p.C240Y, p.P274L, and p.H123R (Claramunt et al., 2005; Chung et al., 2008a; Cassereau et al., 2009; Cavallaro et al., 2009). Each of these mutations has been described in only one family except the p.R120W and the p.H123R changes: p.H123R has been identified in CMT patients from two unrelated families (Cavallaro et al., 2009) and p.R120W in six unrelated families including those of the present work (Claramunt et al., 2005; Cavallaro et al., 2009). The increasing number of dominant missense mutations in the *GDAP1* gene, mainly the p.R120W, undoubtedly shows that some *GDAP1* mutations by themselves cause a mild CMT phenotype.

The mechanism by which a dominantly inherited mutation in the *GDAP1* gene causes disease is largely unknown, although one explanation could be that these dominant mutations could have a negative effect. *GDAP1* is a mitochondrial fission protein localized in the mitochondrial outer membrane, functioning as a tail-anchored protein (Niemann et al., 2005; Pedrola et al., 2005; 2008; Wagner et al., 2009) that promotes fission without increasing the risk of apoptosis (Wagner et al., 2009). The overexpression of *GDAP1* carrying missense mutations including the dominant p.R120W one leads to the fragmentation of the mitochondrial network (Pedrola et al., 2008). Different malfunction in mitochondrial dynamics have been postulated according to the mode of inheritance: recessive *GDAP1* mutations seem to lead to a reduction of fission activity, whereas dominant *GDAP1* mutations may impair mitochondrial fusion and cause mitochondrial aggregation. This latter mechanism may be similar to some pathogenic *MFN2* mutations (CMT2A) in which mitochondrial fusion activity is not overly affected, but there

is excessive mitochondrial aggregation and impairment of mitochondrial transport (Baloh et al., 2007; Detmer and Chan, 2007; Niemann et al., 2009). This observation emphasizes that both *GDAP1* and *MFN2* may be involved in the same pathway of axonal CMT pathophysiology, explaining the clinical and neuroimaging similarities.

Acknowledgements

We are grateful to the propositi and their relatives for their kind collaboration. We also want to thank I. Llopis and M. Escutia for their help with sample management. This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III [PI08/90857, PI08/0889, CP08/00053 and PS09/00095], the Fundación para la Investigación del Hospital Universitari La Fe [CM06/00154], the Spanish Ministry Science and Innovation [grant number SAF2006-01047], and the Generalitat Valenciana [grant no. Prometeo/2009/05]. Dr. C. Espinós has a “Miguel Servet” contract funded by the Fondo de Investigación Sanitaria. Both Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) are initiatives from the Instituto de Salud Carlos III.

References

- 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. *J Hum Genet* 54:94–97.
- Ammar N, Neils E, Merlini L, Barisic N, Amouri R, Ceuterick C, Martin JJ, Timmerman V, Hentati F, De Jonghe P (2003). Identification of novel *GDAP1* mutations causing autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscul Disord* 13:720–728.
- Azzedine H, Ruberg M, Ente D, Gilardeau C, Perie 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. *Neuromuscul Disord* 13:341–346.
- Baloh RH, Schmidt RE, Pestronk A, Milbrandt J (2007). Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J Neurosci* 27:422–430.
- Baxter RV, Ben Othmane K, Rochelle JM, Stajich JE, Hulette C, Dew-Knight S, Hentati F, Ben Hamida M, Bel S, Stenger JE, Gilbert JR, Pericak-Vance MA, Vance JM (2002). Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet* 30:21–22.
- Birouk N, Gouider R, Le Guern E, Gugenheim M, Tardieu S, Maissonobe 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* 120:813–823.
- Boerkoel CF, Takashima H, Nakagawa M, Izumo S, Armstrong D, Butler I, Mancias P, Papasozomenos SC, Stern LZ, Lupski JR (2003). CMT4A: identification of a Hispanic *GDAP1* founder mutation. *Ann Neurol* 53:400–405.
- Calvo J, Funalot B, Ouvrier RA, Lazaro L, Toutain A, De Mas P, Bouche P, Gilbert-Dussardier B, Arne-Bes MC, Carriere JP, Journel H, Minot-Myhie MC, Guillou C, Ghorab K, Magy L, Sturtz F, Vallat JM, Magdelaine C (2009). Genotype-phenotype correlations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2 caused by mitofusin 2 mutations. *Arch Neurol* 66:1511–1516.
- Cassereau J, Chevrollier A, Gueguen N, Malinge MC, Letournel F, Nicolas G, Richard L, Ferre M, Verny C, Dubas F, Procaccio V, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P (2009). Mitochondrial complex I deficiency in *GDAP1*-related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K). *Neurogenetics* 10:145–150.
- Cavallaro T, Ferrarini M, Taioli F, Zimon M, De Jonghe P, Jordanova A, Fabrizi GM (2009). Autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 associated with *GDAP1* gene. Third International Charcot-Marie-Tooth Consortium Meeting, Antwerpen, Belgium.
- Caramunt R, Pedrola L, Sevilla T, Lopez de Munain A, Berciano J, Cuesta A, Sanchez-Navarro B, Millan JM, Saifi GM, Lupski JR, Vilchez JJ, Espinos C, Palau F (2005). Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J Med Genet* 42:358–365.
- Chung KW, Kim SB, Park KD, Choi KG, Lee JH, Eun HW, Suh JS, Hwang JH, Kim WK, Seo BC, Kim SH, Son IH, Kim SM, Sunwoo IN, Choi BO (2006). Early onset severe and late-onset mild Charcot-Marie-Tooth disease with mitofusin 2 (*MFN2*) mutations. *Brain* 129:2103–2118.
- Chung KW, Kim SM, Sunwoo IN, Cho SY, Hwang SJ, Kim J, Kang SH, Park KD, Choi KG, Choi IS, Choi BO (2008a). A novel *GDAP1* Q218E mutation in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *J Hum Genet* 53:360–364.
- Chung KW, Suh BC, Shy ME, Cho SY, Yoo JH, Park SW, Moon H, Park KD, Choi KG, Kim S, Kim SB, Shim DS, Kim SM, Sunwoo IN, Choi BO (2008b). Different clinical and magnetic resonance imaging features between Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and 2A. *Neuromuscul Disord* 18:610–618.
- Cuesta A, Pedrola L, Sevilla T, Garcia-Planells J, Chumillas MJ, Mayordomo F, LeGuern E, Marin I, Vilchez JJ, Palau F (2002). The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet* 30:22–25.
- Detmer SA, Chan DC (2007). Complementation between mouse *Mfn1* and *Mfn2* protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *J Cell Biol* 176:405–414.
- Fleckenstein JL, Watumull D, Conner KE, Ezaki M, Greenlee RG Jr, Bryan WW, Chason DP, Parkey RW, Peshock RM, Purdy PD (1993). Denervated human skeletal muscle: MR imaging evaluation. *Radiology* 187:213–218.
- Gallardo E, Garcia A, Combarros O, Berciano J (2006). Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication: spectrum of clinical and magnetic resonance imaging features in leg and foot muscles. *Brain* 129:426–437.
- Houlden H, Laura M, Ginsberg L, Jungbluth H, Robb SA, Blake J, Robinson S, King RH, Reilly MM (2009). The

- phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease type 4C due to SH3TC2 mutations and possible predisposition to an inflammatory neuropathy. *Neuromuscul Disord* 19: 264–269.
- Lathrop GM, Laouel JM (1984). Easy calculations of lod scores and genetic risks on small computers. *Am J Hum Genet* 36:460–465.
- May DA, Disler DG, Jones EA, Balkissoon AA, Manaster BJ (2000). Abnormal signal intensity in skeletal muscle at MR imaging: patterns, pearls, and pitfalls. *Radiographics* 20. Spec No:S295-315.
- Moroni I, Morbin M, Milani M, Ciano C, Bugiani M, Pagliano E, Cavallaro T, Pareyson D, Taroni F (2009). Novel mutations in the GDAP1 gene in patients affected with early-onset axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A. *Neuromuscul Disord* 19:476–480.
- Nicholson GA, Magdelaine C, Zhu D, Grew S, Ryan MM, Sturtz F, Vallat JM, Ouvrier RA (2008). Severe early-onset axonal neuropathy with homozygous and compound heterozygous MFN2 mutations. *Neurology* 70:1678–1681.
- Niemann A, Ruegg M, La Padula V, Schenone A, Suter U (2005). Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* 170:1067–1078.
- Niemann A, Wagner KM, Ruegg M, Suter U (2009). GDAP1 mutations differ in their effects on mitochondrial dynamics and apoptosis depending on the mode of inheritance. *Neurobiol Dis* 36:509–520.
- Pareyson D, Marchesi C (2009). Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *Lancet Neurol* 8:654–667.
- Pedrola L, Espert A, Wu X, Claramunt R, Shy ME, Palau F (2005). GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum Mol Genet* 14:1087–1094.
- Pedrola L, Espert A, Valdes-Sanchez T, Sanchez-Piris M, Sirkowski EE, Scherer SS, Farinas I, Palau F (2008). Cell expression of GDAP1 in the nervous system and pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *J Cell Mol Med* 12:679–689.
- Senderek J, Bergmann C, Ramaekers VT, Nelis E, Bernert G, Makowski A, Zuchner S, De Jonghe P, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Schroder JM (2003). Mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 (GDAP1) gene in intermediate type autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain* 126:642–649.
- Sevilla T, Cuesta A, Chumillas MJ, Mayordomo F, Pedrola L, Palau F, Vilchez JJ (2003). Clinical, electrophysiological and morphological findings of Charcot-Marie-Tooth neuropathy with vocal cord palsy and mutations in the GDAP1 gene. *Brain* 126:2023–2033.
- Sevilla T, Jaijo T, Nauffal D, Collado D, Chumillas MJ, Vilchez JJ, 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* 131:3051–3061.
- Shy ME, Blake J, Krajewski K, Fuerst DR, Laura M, Hahn AF, Li J, Lewis RA, Reilly M (2005). Reliability and validity of the CMT neuropathy score as a measure of disability. *Neurology* 64:1209–1214.
- Wagner KM, Ruegg M, Niemann A, Suter U (2009). Targeting and function of the mitochondrial fission factor GDAP1 are dependent on its tail-anchor. *PLoS One* 4:e5160.
- Yum SW, Zhang J, Mo K, Li J, Scherer SS (2009). A novel recessive Nefl mutation causes a severe, early-onset axonal neuropathy. *Ann Neurol* 66:759–770.

c. Artículo III:

Vestibular impairment in Charcot Marie Tooth disease type 4C.

Pérez-Garrigues H, Sivera R, Vílchez JJ, Espinós C, Palau F, Sevilla T.

J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2014 Jul;85(7):824-27.

Vestibular impairment in Charcot-Marie-Tooth disease type 4C

ABSTRACT

Charcot-Marie-Tooth disease type 4C (CMT4C) is a hereditary neuropathy with prominent unsteadiness. The objective of the current study is to determine whether the imbalance in CMT4C is caused only by reduced proprioceptive input or if vestibular nerve involvement is an additional factor. We selected 10 CMT4C patients and 10 age-matched and sex-matched controls. We performed a comprehensive evaluation of the vestibular system, including video Head Impulse Test, bithermal caloric test, galvanic stimulation test and skull vibration-induced nystagmus test. None of the patients experienced dizziness, spontaneous or gaze-evoked nystagmus, but all had significant

vestibular impairment when tested when compared to controls. Seven had completely unexcitable vestibular systems and abnormal vestibuloocular reflex. There was no correlation between the degree of vestibulopathy and age or clinical severity. Significant vestibular impairment is a consistent finding in CMT4C and is present early in disease evolution. The profound imbalance that is so disabling in these patients may result from a combination of proprioceptive loss and vestibular neuropathy, and this would modify the recommended rehabilitation strategies.

INTRODUCTION

Recessive mutations of the *SH3TC2* gene cause a demyelinating polyneuropathy (CMT4C, Charcot-Marie-Tooth disease type 4C) which can be quite disabling. It is usually an early-onset disease characterised by unsteadiness, distal weakness, occasional cranial nerve involvement (hearing loss, pupillary abnormalities and/or tongue atrophy), foot and spinal deformities.¹

Postural imbalance is frequent in patients with polyneuropathy and has been attributed to a reduced somatosensory input, but the damage of the vestibular nerve in the neuropathic process could also be a factor. Distinguishing clinical symptoms of vestibular dysfunction in these patients can be quite challenging as they may present without prominent vertigo or dizziness, and comprehensive vestibular testing is complex and time-consuming. Vestibular neuropathy has rarely been described in acquired neuropathies, peroneal muscle atrophies and few forms of CMT.² Recently, Poretti *et al*³ found that vestibular loss was present in 60–75% of patients with different subtypes of CMT.

In our series of patients with CMT4C, we observed a profound postural imbalance exceeding what was expected for the severity of the peripheral neuropathy, and thus decided to perform an exhaustive clinical and instrumental vestibular testing.

METHODS

Patients

We selected ten patients with genetically confirmed CMT4C and ten age-matched and sex-matched controls. The study protocol was approved by the Institutional Review Board of the Hospital U. i P. La Fe. Written informed consents were obtained from all participants.

Clinical evaluation

Subjects were questioned regarding general neuropathic and vestibular symptoms including age of independent walking,

symptom onset, dizziness, unsteadiness worsened by darkness and instability of the visual environment. The neurologic assessments involved a complete neuromuscular evaluation and the CMT neuropathy score (CMTNS). The neurotological examination included the vestibulo-ocular reflex (VOR), evaluation of positional nystagmus with Hallpike manoeuvre and clinical examination of posture and gait with Romberg and Unterberger tests. The most recent neurophysiological data was recorded retrospectively.

Neurotological study

The studies performed were the video Head Impulse Test (vHIT), bithermal caloric test (BCT), galvanic stimulation test (GST) and skull vibration-induced nystagmus test (SVINT). The BCT, GST and SVINT were recorded with videonystagmography in a video based system, SYNAPSIS.

The vHIT was performed with a video system (GN Otometrics). The parameters evaluated were the VOR mean gain and the appearance of refixation saccades (RS), being abnormal if gain was <0.8 or there were RS. The BCT was performed by irrigating the external ear canal with cold (30°C), warm (44°C) and ice water, then recording the maximum velocity of the slow-phase component of nystagmus. The GST was performed with a galvanic stimulator device built by Maastricht Instruments and the SVINT using the VVIB 3F stimulator (Synapsys, France). A response was considered when stimulation produced a reproducible, sustained nystagmus.

Agreeing with Zingler *et al*,⁴ we considered: complete bilateral vestibulopathy if pathological vHIT and bilateral absence of caloric responses, and incomplete bilateral vestibulopathy if reduced BCT responses (<5°/sec) and/or bilateral pathological vHIT.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SPSS V.19 and included unpaired two-tailed t test for case-control mean analysis, and linear regression to compare the degree of vestibulopathy with age or clinical severity. A level of significance of 0.05 was adopted.

RESULTS

The most relevant genetic, clinical and electrophysiological features are summarised in table 1. The series consisted of six women and four men with a mean age of 31 years, and a mean duration of the disease of 15.7 years. All were of Gypsy ethnicity except patients 4 and 8 who were Caucasian. Three subjects admitted

hearing loss, none reported dizziness, but all described unsteadiness worsened by darkness. None presented spontaneous or gaze-evoked nystagmus, but correcting saccades following Halmagyi-Curthoys head impulses were observed in all patients except two. All were extremely unstable and would have fallen (except patient 9) with feet together and closed eyes. None were taking drugs which might interfere with the tests.

Neurotological study

The results of the neurotologic tests are recorded in table 2. Taking all into account 7/10 patients suffered from a complete bilateral vestibular loss and the 3 remaining patients exhibited incomplete vestibulopathy. All the controls had normal vestibular function. The comparison between the group of CMT4C patients and controls revealed statistically significant differences in all the vestibular tests employed. All correlation analyses between vestibular dysfunction and age or clinical severity were clearly non-significant.

DISCUSSION

One of the hallmarks of CMT4C is the presence of unsteadiness and gait instability, which represent early and disabling symptoms. These features have generally been explained by the important sensory loss inherent to this type of CMT, but the presence and relevance of vestibular dysfunction remain unidentified.

Neuropathies of the vestibular nerve have been described in very few patients with diverse subtypes of CMT, and this is the first in depth characterisation of vestibulopathy in a CMT subtype. Our results confirm the presence of significant vestibular impairment in all CMT4C patients tested when compared to age-matched and sex-matched controls. The degree of vestibulopathy is strikingly profound in most cases, but ranges from unexcitable vestibular systems (70%), to a dysfunction expressed exclusively by the presence of refixation saccades in vHIT and the absence of response to SVINT (patient 5). The extent of vestibular dysfunction does not seem to correlate with age and appears early in the disease evolution. We could not find correlation between vestibulopathy and severity expressed by CMTNS; however, this may be partly due to limitations regarding the scale. No clinical or instrumental difference between the Gypsy and the Caucasian patients was noted.

None of our patients had positive vestibular signs (dizziness, nystagmus, etc), and only two referred difficulty in visual fixation. This may be the result of the early

PostScript

Table 1 Clinical characteristics and nerve conduction studies

No.(sex)/Age	Genotype	Indep. walking (months)	Onset (years)	Sensory loss	Motor UL/LL	Cranial nerves	Nerve conduction studies			
							CMTNS	MMNCV (age)	CMAP UL/LL	SNAP UL/LL
1(M) 45	p.R1109X/p.R1109X	20	Delayed walking	All	+/+++	Hearing loss	23	31 m/s (24 y)	7/0	0.6/0
2(F) 12	p.R1109X/p.R1109X	36	Delayed walking	All	+/+++	-	18*	17 m/s (3y)	NP/NP	NP
3(F) 20	p.R1109X/p.C737_P738delinsX	18	Delayed walking	P,V	+/+++	-	19	23 m/s (12y)	10.6/0.5	1.9/0
4(M) 58	p.R529Q/p.R529Q	?	Unstable 10 y	P,V	+/+++	Hearing loss	24	27 m/s (39y)	2.2/0	1/0
5(F) 33	p.R1109X/p.R1109X	22	Delayed walking	All	+/+++	-	23	19 m/s (20y)	4/0	0/0
6(M) 56	p.R1109X/p.R1109X	18	Delayed walking	All	+/+++	Hearing loss Trigeminal neuralgia	20	25.8 m/s (53y)	4.3/0	0/0
7(F) 20	p.R1109X/p.R1109X	30	Delayed walking	All	+/+	-	16	33 m/s (10y)	10/0.1	0.8/0
8(M) 37	p.H1102LfsX14/p.H1102LfsX14	?	Unstable 12 y	All	+/+	-	16	33 m/s (30y)	5.9/0	1.5/0
9(F) 27	p.R1109X/p.C737_P738delinsX	14	Pes cavus 9 y	P,V	+/+++	-	17	34 m/s (27y)	4.2/0	0/0
10(F) 24	p.R1109X/p.C737_P738delinsX	15	Falls 2y	All	+/++++	-	23	36 m/s (24y)	4.1/0	0/0

*Score for patient 2 are CMTES as the nerve conduction studies were incomplete. Patients 1 and 5, and 9 and 10 belong to the same family. CMAP, compound muscle action potential; data of the UL, median nerve (normal values >13.8 mV); CMTNS, CMT Neuropathy score; LL, lower limb; UL, sural nerve (normal values >7.4 mV); LL, sural nerve (normal values >18 μV); MMNCV, median motor nerve conduction velocity (normal values >51.6 m/s); NP, not performed; P, pinprick; SNAP, sensory nerve action potential; data of the UL, median nerve (normal values >16.5 μV); UL, upper limb; V, vibratory.

Table 2 Neurotological studies in patients and comparison to control group

No	Age	Romberg		Caloric-left		Caloric-right		Galvanic		Vibratory		vHIT		RS		
		O	C	30	44	IW	44	30	44	L	R	L	R		Gain-L	Gain-R
1	45	F	F	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0.69	0.79	B
2	12	F	F	0.4	0	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0.47	0.61	B
3	19	I	F	0	0	0	0	0	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
4	58	I	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.51	0.75	B
5	32	F	F	10.5	9.5	35	7	14	8.4	4.9	0	0	0	0.80	0.86	B
6	56	F	F	0	0	0	0	0	NP	NP	0	0	0	0.45	0.39	B
7	20	I	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.86	0.72	B
8	37	I	F	0	0	0	0	0	3	3.1	0	0	0	0.54	0.56	B
9	27	N	I	7.9	12	NP	9.2	21.5	13.3	13.8	0	0	0	0.73	0.67	B
10	24	I	F	4	4.7	28	4.9	0	3.9	4.4	0	0	0	0.64	0.42	B
Controls	15.7	N	N	20.1	27.8	*	24.0	23.7	6.7	6.4	0.4	0.5	0.99	1.01	A	
				p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.05	p<0.05	p<0.001	p<0.001	p<0.005	p<0.005		

Results for controls are means and p values for the comparison with the case group. *Ice water test was not performed in the control group as it provokes a severe vertigo in patients with no vestibulopathy. B, bilateral; C, closed eyes; F, fall; I, instability; IW, ice water; Caloric, galvanic and vibratory tests; expressed in degrees per second; L, left; N, normal; NP, not performed; O, open eyes; R, right; RS, refixation saccades; vHIT, video head impulse test.

and gradual occurrence of the disorder, allowing for the development of mechanisms that compensate the altered vestibular inputs. In any case vestibulopathy is a consistent phenotypic feature of CMT4C in our series, and in keeping with the basic disease process is most likely due to a neuropathy of the vestibular nerve.

Proprioceptive loss was also quite striking in all our patients, and we therefore speculate that the instability typical in CMT4C may result from a combination of proprioceptive loss, vestibular neuropathy and to a lesser degree distal weakness. For clinical neurologists this information is quite relevant as certain vestibular rehabilitation strategies focused in the visual system can be offered to these patients.⁵

Herminio Pérez-Garrigues,¹ Rafael Sivera,² Juan Jesús Vilchez,^{2,3,4} Carmen Espinós,^{5,6,7} Francesc Palau,^{5,6,8} Teresa Sevilla^{2,3,4}

¹Departments of Otolaryngology, Valencia, Spain

²Departments of Neurology, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain

³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Valencia, Spain

⁴Department of Medicine, Ciudad Real, Spain

⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Valencia, Spain

⁶Program on Rare and Genetic Diseases, Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia, Spain

⁷Department of Genetics, University of Valencia, Ciudad Real, Spain

⁸School of Medicine, University of Castilla-La Mancha, Ciudad Real, Spain

Correspondence to Rafael Sivera, Hospital U. i P. La Fe, Bulevar Sur s/n, 46024-Valencia, Spain; rafasivera@gmail.com

Acknowledgements We thank would like to thank Itziar Llopis and Ana Anton for their collaboration.

Contributors HPG: acquisition, analysis and interpretation of data, manuscript revision. RS: analysis and interpretation of data, manuscript elaboration. JJV: critical revision of the manuscript for important intellectual content. CE: genetic screening, FP: critical revision of the manuscript for important intellectual content. TS: study concept and design, manuscript revision.

Funding This collaborative joint project was awarded by IRDiRC and funded by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación within the framework of the National R+D+I Plan [Grants no IR11/TREAT-CMT, P112/00946 and P12/00453], co-funded with FEDER funds and the Generalitat Valenciana [grant no. Prometeo/2009/051]. The Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) and the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) are initiatives from the ISCIII.

Competing interests JJV received research support from the CIBERNED. FP is funded by grants from the Generalitat Valenciana (Prometeo/2009/051), the IRDiRC (IR11/TREAT-CMT) and the CIBERER. CE has a "Miguel Servet" contract funded by the ISCIII and the CIBERER and is funded by grants from the ISCIII (P12/00453) and IRDiRC (IR11/TREAT-CMT). TS is funded by grants from the IRDiRC (IR11/TREAT-CMT) and Fondo de Investigación Sanitaria (P112/00946).

Patient consent Obtained.

Ethics approval Institutional Review Board of the Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

HP-G and RS contributed equally to this work.



CrossMark

To cite Pérez-Garrigues H, Sivera R, Vilchez J J, *et al.* *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014;**85**:824–827.

Received 8 December 2013

Revised 26 January 2014

Accepted 27 January 2014

Published Online First 10 March 2014

J Neurol Neurosurg Psychiatry 2014;**85**:824–827.

doi:10.1136/jnnp-2013-307421

REFERENCES

- 1 Claramunt R, Sevilla T, Lupo V, *et al.* The p.R1109X mutation in SH3TC2 gene is predominant in Spanish Gypsies with Charcot-Marie-Tooth disease type 4. *Clin Genet* 2007;**71**:343–9.
- 2 Palla A, Schmid-Priscoveanu A, Studer A, *et al.* Deficient high-acceleration vestibular function in patients with polyneuropathy. *Neurology* 2009;**72**:2009–13.
- 3 Poretti A, Palla A, Tarnutzer AA, *et al.* Vestibular impairment in patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 2013;**80**:2099–105.
- 4 Zingler VC, Cnyrim C, Jahn K, *et al.* Causative factors and epidemiology of bilateral vestibulopathy in 255 patients. *Ann Neurol* 2007;**61**:524–32.
- 5 Hillier SL, McDonnell M. Vestibular rehabilitation for unilateral peripheral vestibular dysfunction. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;**2**:CD005397.

d. Artículo IV:

Congenital hypomyelinating neuropathy due to a novel MPZ mutation.

Sevilla T, Lupo V, Sivera R, Marco-Marín C, Martínez-Rubio D, Rivas E,
Hernández A, Palau F, Espinós C.

J Peripher Nerv Syst. 2011 Dec;16(4):347-52.

CASE REPORT

Congenital hypomyelinating neuropathy due to a novel *MPZ* mutation

Teresa Sevilla^{1,2}, Vincenzo Lupo³, Rafael Sivera^{1,2}, Clara Marco-Marín^{3,4}, Dolores Martínez-Rubio^{3,4}, Eloy Rivas⁵, Arturo Hernández⁶, Francesc Palau^{3,4}, and Carmen Espinós³

¹Department of Neurology, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Valencia; ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Valencia; ⁴Genetics and Molecular Unit, Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV), CSIC, Valencia; ⁵Department of Pathology, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla; and ⁶Department of Pediatrics, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz, Spain

Abstract Congenital hypomyelinating neuropathy (CHN) is a severe inherited neuropathy with neonatal or early infancy onset, reduced nerve conduction velocity, and pathological evidence of hypomyelination. We describe a case of CHN that presented with neonatal hypotonia and a progressive downhill clinical course, developing cranial nerve dysfunction, and respiratory failure. The nerve conduction velocities were severely slowed and sural nerve biopsy revealed non-myelinated and poorly myelinated axons, with no typical onion bulbs. The mutational screening showed that our proband harbored a novel missense mutation, p.S121F, in the *MPZ* gene. *In silico* analyses and molecular modeling predicted that the replacement of a serine by a phenylalanine is a non-tolerated change and may affect the folding and the stability of the protein. Subcellular location studies were performed and revealed that the mutant protein loses its correct location on the cell membrane surface and is mainly expressed in the cytosol, reducing its adhesive properties. This case illustrates the clinical heterogeneity that exists in neuropathies associated with *MPZ* mutations and highlights that in patients with mild hypotonia in the first months that develop a very severe demyelinating neuropathy, the *MPZ* gene must be taken into account.

Key words: Charcot-Marie-Tooth, congenital hypomyelinating neuropathy, Déjérine-Sottas syndrome, *MPZ* gene, nerve biopsy

Introduction

Congenital hypomyelinating neuropathy (CHN; MIM 605253) is a hereditary demyelinating neuropathy characterized by neonatal or early infancy onset, hypotonia, areflexia, and severe slowing of nerve conduction velocity. There are two clinically distinct

groups of patients with CHN (Phillips *et al.*, 1999). Some patients present in the neonatal period with severe hypotonia, weakness, and frequently develop respiratory failure, while a second group present beyond the neonatal period with hypotonia, delayed motor development, and generally have a milder prognosis. In any case, the sural nerve pathology is quite consistent and shows an almost total lack of myelin sheaths with good preservation of axons. Mutations in several genes encoding for proteins involved in peripheral nerve myelination (*MPZ*, *PMP22*, *EGR2*, *MTMR2*, and *SOX10*) have been described

Address correspondence to: Dr. Teresa Sevilla, Department of Neurology, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Bulevar sur s/n, 46026 Valencia, Spain. Tel: +3496-3862761; Fax: +3496-1973290; E-mail: sevilla_ter@gva.es

Table 1. Electrophysiological findings.

Nerve	Distal latency (ms)	Compound muscle action potential (μ V)	Motor nerve conduction velocity (m/s)	Sensory nerve evoked potential
Median	13.7	559	2.9	NR
Ulnar	12.3	99	3.3	–
Posterior tibial	21.7	143	3.6	–
Sural	–	–	–	NR

NR, no response.

in patients who suffer from CHN, being *de novo* mutations in the *MPZ* gene the most frequent cause. The clinical phenotypes associated with *MPZ* mutations range from severe CHN and Déjérine-Sottas syndrome, to demyelinating Charcot-Marie-Tooth (CMT1) or late onset axonal CMT2. Correlation between specific mutations and the phenotype has been studied (*Shy et al., 2004*), although further studies are necessary to fully characterize the molecular basis underlying the clinical heterogeneity of *MPZ*-associated neuropathies.

Case Report

The patient is a 4-year-old boy who was caesarean born after an uneventful pregnancy. At birth Apgar scores were 10 after 1 and 5 min, and physical examination was normal. Hypotonia was first detected at 4 months of age, but was not studied until he was 6 months old and had not gained weight in the last 3 months. On clinical examination the patient had good visual contact, weak crying and very prominent hypotonia, especially in the axial muscles. He was unable to turn in bed, raise his head or put his feet in the mouth, but could raise his hands in the air and touch one with the other. Deep tendon reflexes were absent. During his instay he developed a respiratory insufficiency that needed ventilatory support and intubation in the critical care unit. Cerebrospinal fluid analysis showed protein levels of 87 mg/dl (normal 15–45 mg/dl). Magnetic resonance imaging of the brain was normal. Nerve conduction studies (Table 1) and sural nerve biopsy (Fig. 1A) at the age of 7 months revealed a severe hypomyelinating neuropathy. Electron microscopy discovered scattered atypical onion bulbs formed by redundant and reduplicated basal lamina, but no typical onion bulbs (Fig. 1B). Muscle biopsy showed fiber size variation, but no indirect signs of denervation like group atrophy (Figs. 1C and 1D).

At 11 months the patient required gastrostomy because of malnutrition. From then on the course has been clearly progressive; the patient is now 4 years

old, requires assisted ventilation and enteral feeding and is unable to perform any voluntary movement at all except with the eyes.

Methods and Results

All protocols performed in this study complied with the ethics guidelines of the institutions involved. The patient's parents were aware of the nature of the studies and gave their consent.

Mutations in the codified regions of the genes *PMP22* (NM_000304.2) included the CMT1A duplication by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (SALSA kit P033 CMT1, MRC Holland), *EGR2* (NM_000399.3), and *SOX10* (NM_006941.3) were discarded. The analysis of the *MPZ* gene (NM_000530.4) revealed a novel mutation, c.362C>T (p.S121F; NP_000521.2), in heterozygosis (Fig. 1E). His healthy parents did not carry this change, which was neither identified in 318 chromosomes from healthy controls of Spanish ancestry, suggesting a pathogenic effect for the *MPZ* p.S121F.

We investigated *in silico* the biological relevance of the *MPZ* p.S121F mutation as previously described (*Espinos et al., 2009*). The residue S121 is an evolutionary conserved amino acid, invariant across more than 100 different species (data not shown). Computational analyses performed with the SIFT and PolyPhen algorithms predicted that the *MPZ* p.S121F mutation was probably damaging. Visualization of the structure and of the consequences of the mutations on the 3D structure of the MPZ extracellular domain (Protein Data Bank; entry 1NEU) (*Shapiro et al., 1996*) was carried out using the program Coot (*Emsley and Cowtan, 2004*). The structure of the extracellular domain of MPZ showed that the side chain hydroxyl group of S121 forms a hydrogen bond with T44 (Fig. 1F). The p.S121F mutation implies a replacement of a small polar serine with a large and aromatic highly hydrophobic residue of phenylalanine which would prevent the hydrogen bond and would elicit the misfolding of the protein and so alter its stability.

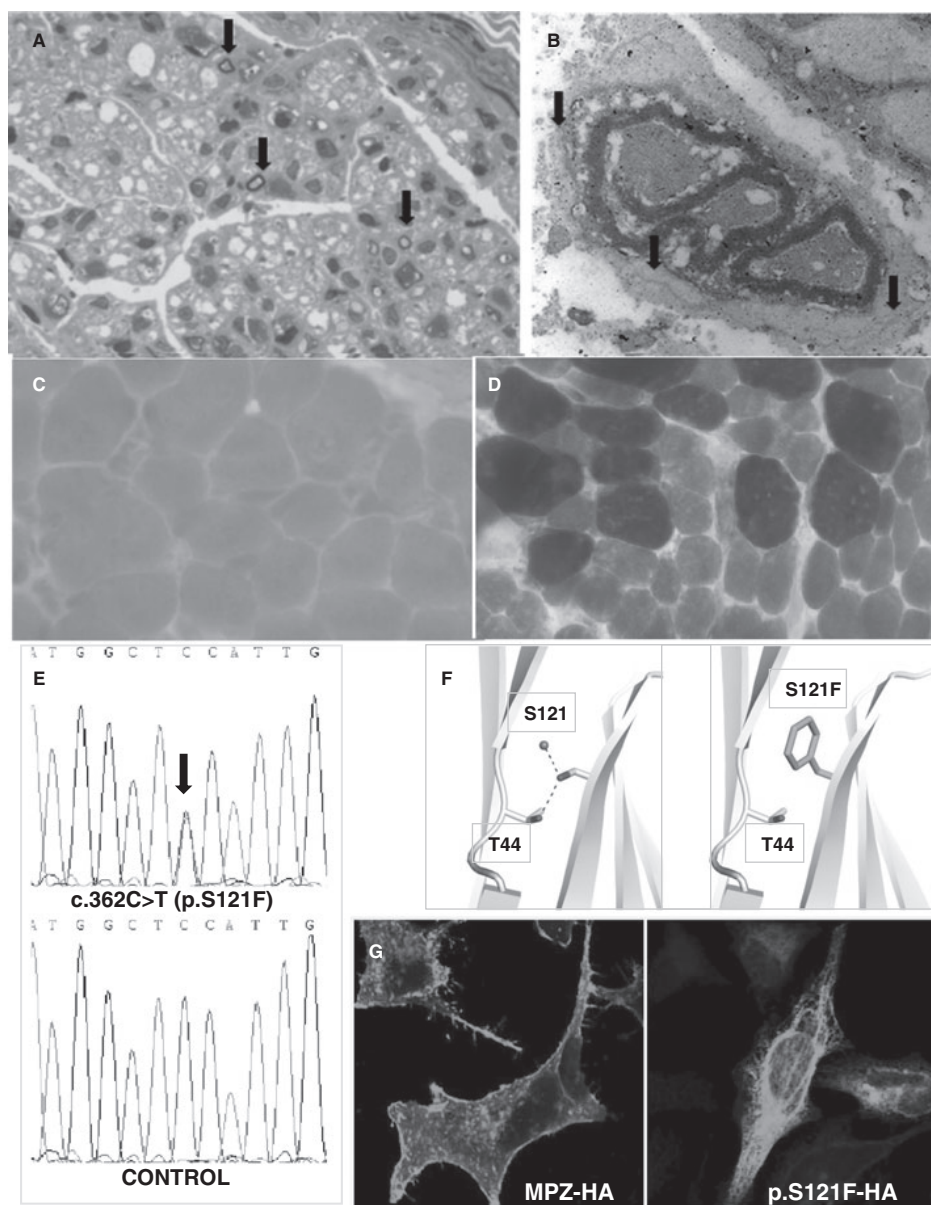


Figure 1. Sural and muscle nerve biopsy, electrophoregram, cellular and structural findings related to the *MPZ* p.S121F mutation. Sural nerve biopsy shows (A) severe reduction of myelinated fibers in semi-thin sections with a few scattered thinly myelinated axons (arrows), (epoxy section, toluidine blue stain, $\times 100$) and (B) re-duplicated basal lamina around thin myelinated fiber (arrows), (electron microscopy). Muscle biopsy (C) shows fiber size variation (HE, $\times 40$) and (D) type I fiber hypotrophy and predominance; no signs of neurogenic atrophy were observed (ATPase pH9.4, $\times 40$). (E) Electrophoregram of the c.362C>T mutation identified in the *MPZ* gene in heterozygosis (arrow). (F) Detail of the MPZ structure to show the interactions mediated by S121 (left panel) and the effect of p.S121F mutation (right panel). (G) Subcellular localization of the wild MPZ protein on the cellular surface (left panel) and of the p.S121F protein in the cytoplasm (right panel).

Table 2. Mutations in *MPZ* with phenotype of congenital hypomyelinating neuropathy.

Phenotype	SR and MNCV	Biopsy	Mutation	References
Hypotonia at 10 months, walks a few steps unassisted at 3.5 years. Scoliosis at age 3 years. Last time visited 8 years.	SR: absent MNCV: 6 m/s (10 m)	Thin myelin sheaths, rare rudimentary OB with EM. Cerebrospinal fluid: 75 mg%	p.Q215X	(Warner et al., 1996)
Hypotonia at 6 months, then stabilization.	SR: not available MNCV: 8.5 m/s	Thin myelin sheaths, uncompacted myelin	p.R69C	(Meijerink et al., 1996)
Downhill clinical course from 10 months onwards. Death 22 m.	SR: absent (2 years) MNCV: 9 m/s	Severe hypomyelination with basal lamina OB	p.R69C	(Phillips et al., 1999)
Hypotonia at 5 months, walked with braces at 2.5 years.	SR: absent MNCV: 4.2 m/s	Loss of myelin fibers, thin myelin sheaths. Atypical OB	p.Q215X	(Mandich et al., 1999)
At 5 years Gowers maneuver. Ataxic gait.	SR: absent MNCV: 11 m/s	Axons with little to no compact myelin and few basal lamina OB.	c.550_552delinsG	(Szigeti et al., 2003)
At 12 m: delayed motor milestones, hypotonia, and scoliosis.	SR: absent (7 years) MNCV: 3 m/s	Lack of normally myelinated fibers. Basal lamina OB.	p.T124K	(Nowakowski and Kochanski, 2004)
At 7 years distal muscle wasting and sensory ataxia.	SR: no performed (10 days) MNCV: 4 m/s MNCV: no response.	No myelinated fibers. No OB.	p.L184AfsX51	(Smit et al., 2008)
Hypotonia and arthrogyposis at birth with respiratory failure. NSV until 31 m. At this time she was able to crawl and kneel.	No SR or MNCV	Nearly complete absence of myelination	p.L184AfsX51	(Smit et al., 2008)
Floppy infant and delayed motor milestones. At 7 years able to walk with support. Scoliosis and chest deformation. At 12 years unable to walk.	No SR or MNCV	Demyelination. Occasional OB-like formations	c.368_382del	(McMillan et al., 2010)
Hypotonia, arthrogyposis, difficulty in swallowing, and pneumonia. Respiratory support until 3 m. Father: 27 years. Infancy: hypotonia, swallowing, and respiratory difficulties. Scoliosis.	No SR or MNCV		p.N131K	(McMillan et al., 2010)
Walks with aid at 4 years, not progressive. Partly wheelchair bound.				
5 m. Hypotonia and failure to thrive				
3 years. Hypotonia delayed motor acquisitions. Walk 2.5 years				

EM, electron microscopy; MNCV, motor nerve conduction velocity; NVS, nocturnal ventilatory support; OB, onion bulb; SR, sensory response.

The human full-length cDNA of *MPZ* was obtained using the human MGC Verified FL cDNA clone (ID: 3926008; Open Biosystems), which was subcloned in-frame into the mammalian expression vector pcDNA3-HA, to produce the MPZ-HA construct. The construct p.S121F-HA was generated with specific primers containing the nucleotide change using the QuickChange® Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene). HeLa cells were grown, transiently transfected with either MPZ-HA or p.S121F-HA construct, and further analyzed as described elsewhere (Lupo et al., 2009). The subcellular localization studies showed that the MPZ-HA construct was correctly expressed on the cellular surface, and in contrast, the p.S121F-HA construct presented a cytoplasmic expression (Fig. 1G). The mutant protein therefore lost its correct localization on the cell surface.

Discussion

The proband suffered from a CHN caused by a *de novo* *MPZ* p.S121F mutation, which has deleterious effects on the protein function according to the *in silico* and molecular modeling analyses performed. Moreover, the subcellular localization studies showed that the mutant protein is retained in the cytoplasm and potentially decreases the MPZ-mediated adhesion. Other *MPZ* mutants retained in the cytoplasm have been demonstrated to provoke unfolded protein response and apoptosis (Khajavi et al., 2005; Wrabetz et al., 2006; Pennuto et al., 2008), possibly related to the accumulation of excessive improperly folded proteins (Harding et al., 2002). Independently of the molecular pathomechanism of *MPZ* mutant proteins trapped within the cytosol, the reduction of adhesive functions has been demonstrated in some of them and usually leads to early onset demyelinating neuropathies (Grandis et al., 2008; Lee et al., 2008).

Mutations in *MPZ* result in a wide spectrum of clinical phenotypes, which is probably determined by the location and type of the pathogenic mutation. Several arguments support this hypothesis. First, the same mutation has been reported in different subjects with identical clinical phenotype as the sporadic p.Q215X (Warner et al., 1996; Mandich et al., 1999) or familial p.L184AfsX51 (Smit et al., 2008). Second, several mutations, such as the p.F64del (Ikegami et al., 1996) and p.V102del (Pareyson et al., 1999) deletions, have been described in homozygous and heterozygous states with different severity. The heterozygous individuals present with a mild CMT1 phenotype while the homozygous carriers have a severe DS phenotype. Third, certain missense mutations in the *MPZ* gene

affect the same codon but with a different amino acid change resulting in completely different phenotypes. The p.T124K mutation causes CHN (Nowakowski and Kochanski, 2004) while the p.T124M mutation causes a milder CMT2 phenotype (De Jonghe et al., 1999). In fact, the p.S121C mutation which affects the same residue as in our patient has been reported associated with a CMT1 phenotype (Mandich et al., 2009).

For a concise diagnosis of CHN, compatible nerve pathology is mandatory, because the differentiation from DS on clinical grounds alone can be quite difficult. This has resulted in some inconsistency in the nosology of the literature, and after a comprehensive review of the available pathological phenotypes, nine *MPZ* mutations actually seem to be associated with CHN (Table 2). The concept of hypomyelination implies a congenital onset and non-progressive or slowly progressive course unless axon degeneration intervenes. Clinically, most cases show a slow sustained improvement over time instead of progressive decline, but some have a very severe phenotype, with neonatal hypotonia, progressive weakness, ventilatory support, and sometimes resulting in death.

The muscle biopsy in our case revealed no classic features of denervation, and good fiber type differentiation. In a patient reported with the *MPZ* c.550_552delinsG mutation, there was no differentiation of the fiber type (Szigeti et al., 2003). This could be related to the different ages at time of biopsy or to the severity of clinical findings at birth. In our patient there was probably an acceptable postnatal innervation, in fact clinical features went unnoticed during the first 3 months, while the patient without fiber type differentiation was born with arthrogriposis and severe respiratory failure.

The proband presented has a phenotypic peculiarity because he had normal development until the age of 3 months, followed by 3–4 months of stabilization and from then on a progressive decline until he developed complete paralysis of all voluntary muscles except for the eyes, thus resembling a locked-in syndrome. A similar clinical course was described in a patient with the *MPZ* p.R69C mutation reported as a DS phenotype, but the clinical course and pathological findings seem to be consistent with CHN (Meijerink et al., 1996).

In summary, the patient reported suffered a severe rapidly progressive CHN neuropathy caused by a previously unreported *MPZ* p.S121F mutation. The spectrum of phenotypes and *MPZ* mutations is broad and must be taken into account in patients with mild hypotonia in the first months that develop a very severe demyelinating neuropathy with complete paralysis.

Acknowledgements

We would like to thank the propositus' parents for their kind collaboration. We are thankful to Dr. D. Baretino (Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC), who kindly provided us the vector pcDNA3-HA to perform the subcellular location studies. This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (Grants number PI08/90857, PI08/0889, CP08/00053, and PS09/00095) co-funded with FEDER funds. C. E. has a "Miguel Servet" contract funded by the Instituto de Salud Carlos III. The CIBERNED and the CIBERER are initiatives of the Instituto de Salud Carlos III.

References

- De Jonghe P, Timmerman V, Ceuterick C, Nelis E, De Vriendt E, Lofgren A, Vercruyssen A, Verellen C, Van Maldergem L, Martin JJ, Van Broeckhoven C (1999). The Thr124Met mutation in the peripheral myelin protein zero (MPZ) gene is associated with a clinically distinct Charcot-Marie-Tooth phenotype. *Brain* 122:281–290.
- Emsley P, Cowtan K (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60:2126–2132.
- Espinosa C, Pineda M, Martinez-Rubio D, Lupo V, Ormazabal A, Vilaseca MA, Spaapen LJ, Palau F, Artuch R (2009). Mutations in the urocanase gene UROC1 are associated with urocanic aciduria. *J Med Genet* 46:407–411.
- Grandis M, Vigo T, Passalacqua M, Jain M, Scazzola S, La Padula V, Brucal M, Benvenuto F, Nobbio L, Cadoni A, Mancardi GL, Kamholz J, Shy ME, Schenone A (2008). Different cellular and molecular mechanisms for early and late-onset myelin protein zero mutations. *Hum Mol Genet* 17:1877–1189.
- Harding HP, Calfon M, Urano F, Novoa I, Ron D (2002). Transcriptional and translational control in the mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:575–599.
- Ikegami T, Nicholson G, Ikeda H, Ishida A, Johnston H, Wise G, Ouvrier R, Hayasaka K (1996). A novel homozygous mutation of the myelin Po gene producing Dejerine-Sottas disease (hereditary motor and sensory neuropathy type III). *Biochem Biophys Res Commun* 222:107–110.
- Khajavi M, Inoue K, Wiszniewski W, Ohyama T, Snipes GJ, Lupski JR (2005). Curcumin treatment abrogates endoplasmic reticulum retention and aggregation-induced apoptosis associated with neuropathy-causing myelin protein zero-truncating mutants. *Am J Hum Genet* 77:841–850.
- Lee YC, Yu CT, Lin KP, Chang MH, Hsu SL, Liu YF, Lu YC, Soong BW (2008). MPZ mutation G123S characterization: evidence for a complex pathogenesis in CMT disease. *Neurology* 70:273–277.
- Lupo V, Galindo MI, Martinez-Rubio D, Sevilla T, Vilchez JJ, Palau F, Espinosa C (2009). Missense mutations in the SH3TC2 protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4C affect its localization in the plasma membrane and endocytic pathway. *Hum Mol Genet* 18:4603–4614.
- Mandich P, Mancardi GL, Varese A, Soriani S, Di Maria E, Bellone E, Bado M, Gross L, Windebank AJ, Ajmar F, Schenone A (1999). Congenital hypomyelination due to myelin protein zero Q215X mutation. *Ann Neurol* 45:676–678.
- Mandich P, Fossa P, Capponi S, Geroldi A, Acquaviva M, Gulli R, Ciotti P, Manganelli F, Grandis M, Bellone E (2009). Clinical features and molecular modelling of novel MPZ mutations in demyelinating and axonal neuropathies. *Eur J Hum Genet* 17:1129–1134.
- McMillan HJ, Santagata S, Shapiro F, Batish SD, Couchon L, Donnelly S, Kang PB (2010). Novel MPZ mutations and congenital hypomyelinating neuropathy. *Neuromuscul Disord* 20:725–729.
- Meijerink PH, Hoogendijk JE, Gabreels-Festen AA, Zorn I, Veldman H, Baas F, de Visser M, Bolhuis PA (1996). Clinically distinct codon 69 mutations in major myelin protein zero in demyelinating neuropathies. *Ann Neurol* 40:672–675.
- Nowakowski A, Kochanski A (2004). Screening of the myelin protein zero gene in patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Biochim Pol* 51:273–280.
- Pareyson D, Sghirlanzoni A, Bolti S, Ciano C, Fallica E, Mora M, Taroni F (1999). Charcot-Marie-Tooth disease type 2 and P0 gene mutations. *Neurology* 52:1110–1111.
- Pennuto M, Tinelli E, Malaguti M, Del Carro U, D'Antonio M, Ron D, Quattrini A, Feltri ML, Wrabetz L (2008). Ablation of the UPR-mediator CHOP restores motor function and reduces demyelination in Charcot-Marie-Tooth 1B mice. *Neuron* 57:393–405.
- Phillips JP, Warner LE, Lupski JR, Garg BP (1999). Congenital hypomyelinating neuropathy: two patients with long-term follow-up. *Pediatr Neurol* 20:226–232.
- Shapiro L, Doyle JP, Hensley P, Colman DR, Hendrickson WA (1996). Crystal structure of the extracellular domain from P0, the major structural protein of peripheral nerve myelin. *Neuron* 17:435–449.
- Shy ME, Jani A, Krajewski K, Grandis M, Lewis RA, Li J, Shy RR, Balsamo J, Lilien J, Garbern JY, Kamholz J (2004). Phenotypic clustering in MPZ mutations. *Brain* 127:371–384.
- Smit LS, Roofthoof D, van Ruissen F, Baas F, van Doorn PA (2008). Congenital hypomyelinating neuropathy, a long term follow-up study in an affected family. *Neuromuscul Disord* 18:59–62.
- Szigeti K, Saifi GM, Armstrong D, Belmont JW, Miller G, Lupski JR (2003). Disturbance of muscle fiber differentiation in congenital hypomyelinating neuropathy caused by a novel myelin protein zero mutation. *Ann Neurol* 54:398–402.
- Warner LE, Hilz MJ, Appel SH, Killian JM, Kolodry EH, Karpati G, Carpenter S, Watters GV, Wheeler C, Witt D, Bodell A, Nelis E, Van Broeckhoven C, Lupski JR (1996). Clinical phenotypes of different MPZ (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth type 1B, Dejerine-Sottas, and congenital hypomyelination. *Neuron* 17:451–460.
- Wrabetz L, D'Antonio M, Pennuto M, Dati G, Tinelli E, Fratta P, Previtali S, Imperiale D, Zielasek J, Toyka K, Avila RL, Kirschner DA, Messing A, Feltri ML, Quattrini A (2006). Different intracellular pathomechanisms produce diverse Myelin Protein Zero neuropathies in transgenic mice. *J Neurosci* 26:2358–2368.

e. Algoritmos diagnósticos:

Con la información clínica recopilada durante estos años, y teniendo en cuenta las frecuencias relativas tanto en nuestra serie de pacientes como en la literatura, se diseñaron una serie de algoritmos para tratar de realizar un estudio genético racional y adaptado a la población de la Comunidad Valenciana.

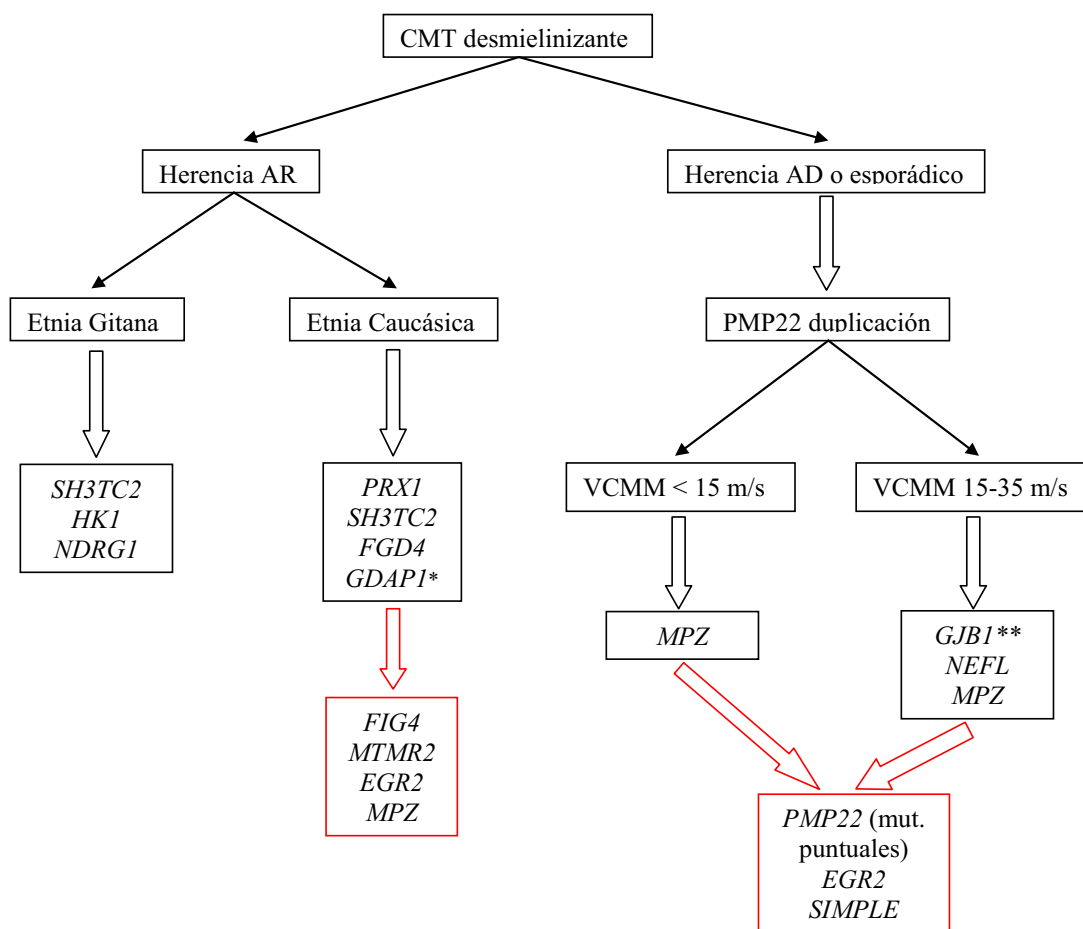


Figura 13: Algoritmo para el diagnóstico genético en CMT desmielinizante.

*: Los pacientes con mutaciones *GDAP1* recesivas se han descrito ocasionalmente como desmielinizantes aunque en nuestra serie las velocidades de conducción a músculos proximales siempre estaban en rango axonal.

** : Siempre que no exista transmisión varón-varón.

Los pasos marcados en rojo pueden sustituirse por la utilización de paneles de genes o técnicas de secuenciación exómica.

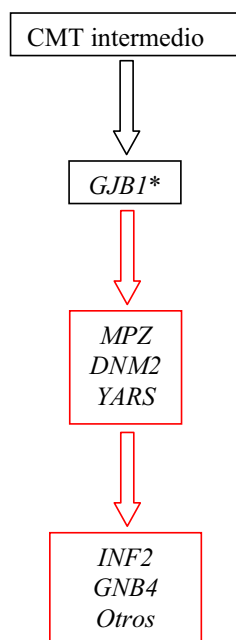


Figura 14: Algoritmo para el diagnóstico genético en CMT intermedio.

*: Siempre que no exista transmisión varón-varón.

Los pasos marcados en rojo pueden sustituirse por la utilización de paneles de genes o técnicas de secuenciación exómica.

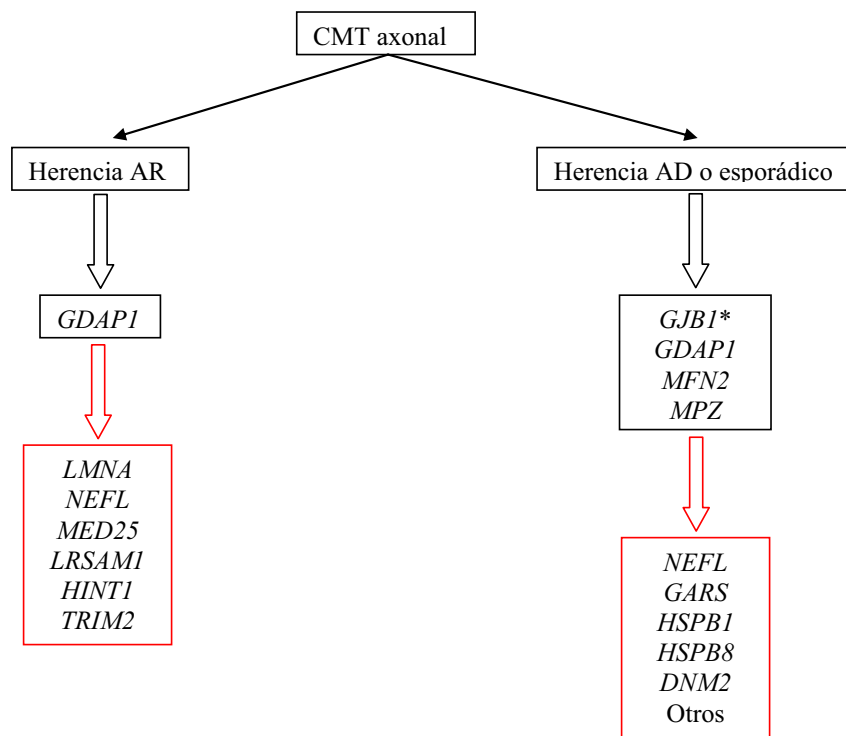


Figura 15: Algoritmo para el diagnóstico genético en CMT axonal.

*: Siempre que no exista transmisión varón-varón.

Los pasos marcados en rojo pueden sustituirse por la utilización de paneles de genes o técnicas de secuenciación exómica.

5) DISCUSIÓN

a. Artículo I:

i. Resumen de resultados:

Se trata de un estudio longitudinal descriptivo sobre las características clínicas y la distribución mutacional de todos los pacientes con diagnóstico de CMT evaluados en el Hospital Universitari i Politècnic La Fe durante los años 2000-2012. De los 438 pacientes con CMT, 62.8% se clasificaron como desmielinizantes y 37,8% como axonales. Tras el cribaje mutacional extenso se consiguió el diagnóstico genético en 365 pacientes (83.3%), siendo mayor el porcentaje en pacientes con fenotipo desmielinizante (95.6%) que axonal (62,6%).

El diagnóstico genético más frecuente en pacientes con fenotipo desmielinizante fue la duplicación en el gen *PMP22* correspondiente con CMT1A (76.3%), seguido de las mutaciones en el gen *GJB1*, que se encontraron tanto en pacientes clasificados como CMT desmielinizante o axonal. Existía un grupo importante de pacientes de etnia gitana con fenotipo desmielinizante y herencia AR, y en todos ellos se encontraron mutaciones fundadoras asociadas a dicha etnia en los genes *SH3TC2*, *NDRG1* y *HK1*. El resto de diagnósticos genéticos en pacientes con CMT1/CMT4 fueron mucho menos frecuentes (9 en *MPZ*, 4 en *PRX*, 2 mutaciones puntuales en *PMP22*, 2 en *FGD4*, 2 en *SH3TC2*, y 1 en *NEFL*) e incluía 3 mutaciones noveles.

En los pacientes con un fenotipo axonal la heterogeneidad genética fue mucho más marcada, siendo la causa más frecuente las mutaciones en *GDAP1* (tanto AR como AD), seguidas de las mutaciones en *GJB1*. Las mutaciones en otros genes fueron mucho menos frecuentes (10 en *MPZ*, 7 en *HSPB1*, 4 en *MFN2*, 3 en *HSPB8*, 3 en *NEFL*, 1 en *GARS* y 1 en *KARS*). 10 de ellas eran mutaciones noveles.

ii. Discusión:

La descripción fenotípica y genotípica de pacientes con CMT en distintas regiones es fundamental para conocer la distribución mutacional global de la enfermedad. En este caso se trata de la serie más numerosa y con un cibaje mutacional más amplio de España y de toda la región mediterránea. Aparte, se describe el fenotipo de 13 mutaciones que no se habían descrito previamente en la literatura, ampliando el conocimiento de la correlación genotipo-fenotipo en dichos genes. Cuando se compara con series anglosajonas publicadas con una sistemática similar se puede observar que existen una serie de características diferenciadoras.

Una de ellas es que existe una mayor frecuencia de pacientes con herencia AR, en parte debido a la población de etnia gitana y a que existen áreas geográficas en la Comunidad Valenciana donde existe una elevada tasa de consanguinidad.

La otra es que en la serie de pacientes con CMT2 la causa más frecuente son las mutaciones en el gen *GDAP1*, mientras que estas mutaciones son muy poco frecuentes en la población anglosajona. De hecho, se postula que esto se debe a que la mutación p.R120W en dicho gen, que ocasiona la gran mayoría de pacientes con herencia dominante en nuestra serie, debe tener un efecto fundador en el oeste europeo. Asimismo, cabe destacar que las mutaciones en el gen *MFN2* son la causa más frecuente de CMT2 en múltiples series (habitualmente del 10-33%), incluso algunas españolas, mientras que en nuestra población y en otras series publicadas es una causa poco frecuente (2,5%). Esto subraya la variabilidad de la distribución genética en las distintas áreas y la necesidad de información regional sobre las determinadas peculiaridades genotípicas.

b. Artículo II:

i. Resumen de resultados:

Se trata de un estudio descriptivo sobre las características clínicas, electrofisiológicas, anatomopatológicas y de RM muscular de una serie de pacientes con CMT debido a mutaciones dominantes en el gen *GDAP1* evaluados en el Hospital Universitari i Politècnic La Fe. Se encontraron 17 pacientes pertenecientes a 4 familias no emparentadas y todos ellos presentaban la mutación p.R120W. Clínicamente existía una variabilidad importante en cuanto a la gravedad, existiendo 4 pacientes asintomáticos (uno con 72 años) y otros pacientes con gran discapacidad. Además, en varios pacientes se observó como pasaban de una situación clínica prácticamente quiescente a progresar rápidamente en pocos años. En cuanto a las manifestaciones clínicas, generalmente debutaban sintomáticamente con debilidad distal en miembros inferiores que ocasionaba tropiezos y caídas frecuentes. Habitualmente la debilidad en la flexión y en la extensión del tobillo era bastante análoga, a diferencia de otros subtipos de CMT. En 7 pacientes existía debilidad distal en miembros superiores y sólo en 2 se encontró debilidad proximal en miembros inferiores. Asociaban deformidades óseas en pies, disminución de reflejos e hipoestesia proporcional al déficit motor sin otras características asociadas.

Neurofisiológicamente, se encontraron velocidades de conducción, ondas F y latencias distales normales con reducción de amplitudes en miembros inferiores y, en menor medida, en miembros superiores, así como signos de denervación en músculos distales de miembros inferiores.

En la RM muscular de miembros inferiores se observaron alteraciones en todos los pacientes, incluso en los asintomáticos. El hallazgo primordial fue una atrofia con sustitución grasa en los vientres musculares con un gradiente distal-proximal.

En la pantorrilla, además, existía un patrón de atrofia y sustitución grasa particular, ya que se infiltraba el compartimento posterior más que el anterolateral, a diferencia de la mayoría de subtipos, inclusive el CMT1A.

En algún paciente con fenotipo leve se encontró edema muscular en pantorrillas, pero no fue un hallazgo consistente.

Histológicamente, existía una reducción de fibras mielínicas, sobre todo de gran tamaño con reducción en el grosor de la mielina. Aparte, existían signos de degeneración axonal, con clusters regenerativos y estructuras tipo bulbos de cebolla. Cuando se observaron con microscopía electrónica dichas estructuras tenían menos capas que los bulbos de cebolla clásicos y rodean a clusters regenerativos, fibras hipomielinizadas o rara vez fibras mielinizadas. La compactación de mielina parecía normal pero sí se diferenciaban signos de degeneración axonal en algunas fibras (retracción del axolema, agregación anormal de mitocondrias, disolución de microtúbulos, etc.).

ii. Discusión:

Las mutaciones dominantes en el gen *GDAP1* son una causa poco frecuente de CMT en otras series, por lo que la descripción exhaustiva del fenotipo de estos 17 pacientes tiene gran relevancia clínica. Cabe destacar que todos los pacientes tienen la misma mutación (p.R120W), que también se ha descrito en pacientes en Bélgica a Italia, existiendo un probable efecto fundador del oeste europeo. Clínicamente se describe un fenotipo CMT2 'clásico', pero con una serie de peculiaridades relevantes. La primera es la variabilidad clínica tanto intra como interfamiliar, probablemente asociada a factores modificadores tanto genéticos como epigenéticos. También cabe destacar el hecho de que se afecte la dorsiflexión el tobillo y la flexión plantar del mismo en el mismo grado inicialmente.

Esto contrasta con los pacientes con CMT1A en que primero existe una debilidad de la dorsiflexión (pie caído) por afectación de la musculatura anterolateral de la pantorrilla.

Dichos hallazgos se confirman mediante la RM muscular donde se observa que, aparte del patrón distal>proximal propio de pacientes con CMT, en la pantorrilla predomina la sustitución grasa del compartimento posterior (soleo, gastrocnemius) sobre el anterolateral. Este patrón de RM muscular en pantorrilla no es específico porque se ha descrito en otros subtipos de CMT (CMT2A, etc.) pero sí parece ser altamente sugestivo de esta enfermedad.

El otro hallazgo destacable son los hallazgos de las dos biopsias de nervio sural que muestran como una polineuropatía inicialmente axonal (pérdida de fibras, clusters regenerativos, agregación mitocondrial y degeneración de microtúbulos del axoplasma) puede asociar signos de alteración de la mielina (adelgazamiento mielínico, pseudo bulbos de cebolla). De hecho, en los pacientes con mutaciones en el gen *GDAP1* y herencia AR aún existe cierta controversia sobre si deben clasificarse como CMT tipo desmielinizante o axonal. En nuestra serie de pacientes tanto recesivos como dominantes los estudios de conducción nerviosa son claramente axonales, pero histológicamente sí que existen alteraciones mielínicas asociadas que podrían ser secundarias a la axonopatía.

c. Artículo III:

i. Resumen de resultados:

Se trata de un estudio de casos y controles en el que se comparó la función vestibular de 10 pacientes con CMT debido a mutaciones recesivas en *SH3TC2* con 10 controles ajustados por sexo y edad. El objetivo de dicha comparación era ver si la inestabilidad propia de este subtipo de CMT estaba influenciada por una afectación vestibular asociada. Clínicamente no se encontró nistagmus espontáneo, pero sí sacadas correctoras tras

impulsos cefálicos laterales bruscos, e inestabilidad prominente, siendo imposible mantener la bipedestación con pies juntos y ojos cerrados en todos los pacientes salvo uno. En todas las pruebas complementarias que se utilizaron para medir la función vestibular se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes y los controles. De hecho, 7 de los 10 pacientes presentaban una vestibulopatía bilateral completa, que refleja un sistema vestibular completamente inexcitable. Los otros 3 tenían una alteración en las pruebas vestibulares, pero en menor grado que los anteriores, efectivamente había una paciente que sólo se demostró la vestibulopatía en la prueba de vHIT (video head impulse test) y con la estimulación vibratoria.

ii. Discusión:

Los pacientes con mutaciones en *SH3TC2* pueden asociar afectación de pares craneales como parte del fenotipo, pero la existencia de una afectación vestibular tan prominente no era conocida previamente. En consonancia con la fisiopatología de la enfermedad, creemos que dicha vestibulopatía corresponde con una neuropatía del nervio vestibular (afectación del VIII par craneal).

Todos los pacientes explorados tenían una afectación vestibular importante, y el 70% un sistema vestibular completamente inexcitable. El grado de afectación vestibular no se pudo correlacionar con la edad ni con las escalas empleadas para definir la gravedad, pero esto puede deberse en parte al escaso número de pacientes, y a las limitaciones de las escalas empleadas. Por tanto, no podemos asegurar el grado en el que influye la afectación vestibular sobre la inestabilidad, que también puede estar causada por hipoestesia propioceptiva y en menor medida por la debilidad distal en miembros inferiores.

En cualquier caso, la existencia de una vestibulopatía tan prominente puede modificar el planteamiento de las terapias rehabilitadoras, ya que se pueden emplear tratamientos centrados en la fijación visual.

d. Artículo IV:

i. Resumen de resultados:

Se trata de un estudio descriptivo centrado en un caso clínico de un paciente con un fenotipo de neuropatía hipomielinizante congénita asociado a una mutación novel en el gen *MPZ*. El paciente debutó sintomáticamente a los 4 meses con hipotonía y escasa ganancia ponderal. Durante los siguientes 4 años el cuadro fue rápidamente progresivo, desarrollando una parálisis completa de toda la musculatura salvo los movimientos oculares y necesitando de una gastrostomía para asegurar la alimentación y ventilación asistida. Electrofisiológicamente, hay un enlentecimiento importante de las velocidades de conducción ($< 3,5$ m/s) con alargamiento de las latencias distales y caída de amplitudes. Se realizó una biopsia de nervio sural que demostró una ausencia casi completa de fibras mielinizadas, quedando fibras amielínicas o escasamente mielinizadas, así como bulbos de cebolla compuestos por plegamientos de membrana basal.

En la secuenciación de *MPZ* se encontró un cambio novel en heterocigosis que no estaba presente en los padres. Se estudió *in silico* la patogenicidad de la mutación y se determinó que la sustitución de fenilalanina por serina en dicha localización probablemente impedía un enlace de hidrógeno que se demostró esencial para el plegamiento de la proteína transcrita. También se realizó un estudio de localización subcelular en células HeLa y se observó que la proteína mutante perdía la localización en la superficie celular presente en la 'wild type' y se localizaba en el citoplasma, reduciendo las propiedades adhesivas.

ii. Discusión:

Las mutaciones en el gen *MPZ* se asocian a una variabilidad fenotípica muy amplia que va desde neuropatías hipomielinizantes congénitas a neuropatías de inicio en el adulto y de carácter axonal o intermedio. Este caso subraya dicha variabilidad fenotípica, ya que es una mutación novel que se une a las 9 mutaciones en *MPZ* descritas que pueden ocasionar un fenotipo similar. Clínicamente lo más llamativo del caso es la gravedad del mismo y que el desarrollo durante los primeros 3-4 meses fue normal. Las pruebas complementarias certifican que en efecto se trata de una neuropatía hipomielinizante congénita, donde la mielinización no se llega a producir o se afecta en estadios muy precoces de la misma.

Los estudios *in silico* y los de localización subcelular confirman la patogenicidad de una mutación novel y aportan información sobre el posible mecanismo por el cual dicha mutación afecta el plegamiento y por tanto la estructura proteica.

e. Algoritmos diagnósticos:

Los algoritmos diagnósticos son importantes para tratar de orientar el abordaje de enfermedades como el CMT, donde existe una gran heterogeneidad clínica y genética.

El objetivo de los mismos es servir de ayuda para los profesionales que se encuentren ante un paciente con CMT en la Comunidad Valenciana.

Deben tomarse simplemente como una herramienta de apoyo, y no pueden sustituir a una evaluación fenotípica detallada, ya que esta puede ser indicativa de un diagnóstico genético concreto.

Aparte, hay que tener en cuenta que los algoritmos diagnósticos no deben ser estáticos en enfermedades donde continuamente aparece nueva información que debe ser considerada.

Por ejemplo, durante este último año se han descrito nuevos genes implicados en CMT, características fenotípicas no conocidas previamente y ha continuado el avance de las técnicas de biología molecular, de manera que el estudio mediante paneles de genes o estudio exómico completo ya está a la orden del día. Por estos motivos, el estudio de esta enfermedad puede ser iniciado localmente, pero si no se encuentran los subtipos genéticos más comunes, los pacientes deben ser evaluados en un centro de referencia que tenga una amplia experiencia clínica y acceso a tecnología avanzada.

La división inicial del algoritmo se basa en la agrupación de pacientes con CMT en subtipos axonal, desmielinizante e intermedio. Pese a sus limitaciones y posibles solapamientos, sigue siendo un punto de partida muy útil para orientar el diagnóstico genético.

En los pacientes con CMT **desmielinizante**, el siguiente punto a considerar es el modo de herencia. Si la sospecha es que sea una herencia AR, tenemos que considerar la etnia del paciente, ya que existen un gran número de pacientes de etnia gitana con CMT4 y en ellos debemos buscar inicialmente las mutaciones fundadoras gitanas en *SH3TC2*, *HK1* y *NDRG1*. En los pacientes de etnia caucásica, la heterogeneidad genética es más amplia y el fenotipo debe ser analizado detalladamente por si orienta a un diagnóstico genético concreto. Según nuestros datos las mutaciones en los genes *PRXI*, *SH3TC2* y *FGD4* son algo más frecuentes que otras posibilidades (*FIG4*, *MTMR*, *EGR2*, *MPZ*...), pero aun así debe prevalecer la orientación fenotípica, pudiendo incluso utilizar tecnología genética de nueva generación como paneles de genes o secuenciación exómica. Mención aparte merece el gen *GDAP1*, ya que se han descrito pacientes con CMT4 por mutaciones recesivas en este gen, aunque en nuestra serie todos los pacientes con dichas mutaciones tienen un fenotipo electrofisiológico axonal. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que en pacientes con un fenotipo tan grave, las conducciones nerviosas distales

habitualmente presentan amplitudes muy disminuidas, con velocidades de conducción poco valorables por este motivo. En nuestra serie las conducciones a músculos proximales, que están más preservados, revelan velocidades de conducción normales con caídas leve de amplitud. Pese a ello, histológicamente sí que existen anomalías en la mielina junto con una importante degeneración axonal. Por tanto, es un diagnóstico genético que puede considerarse en estos pacientes.

En los pacientes con CMT desmielinizante y herencia AD o desconocida se debe descartar inicialmente la duplicación del gen *PMP22* causante de CMT1A. Si esta es negativa, se utiliza la velocidad de conducción motora del nervio mediano para orientar el siguiente paso. Si esta resulta menor de 15 m/s el primer gen a considerar es *MPZ*, mientras que si es mayor a 15 m/s, podríamos seguir teniendo en cuenta al gen *MPZ*, pero también *NEFL* y sobre todo *GJB1*. Sobre este último cabe destacar que la herencia es ligada al X, por lo que la existencia de transmisión varón-varón imposibilita que sea la causa genética subyacente. Si llegados a este punto sigue sin conocerse la mutación causal se deben estudiar las posibles causas más raras de CMT1 (mutaciones puntuales de *PMP22*, *EGR2*, *SIMPLE*, *FBLN5*, etc.) bien de manera secuencial o con tecnología avanzada.

El término de **CMT intermedio** utilizado en los algoritmos se debe interpretar en el contexto de una familia (no un único paciente) cuyos miembros tienen velocidades de conducción variables en el rango 25-45 m/s. En esos casos el primer gen a considerar es *GJB1*, siempre que no exista transmisión varón-varón en la familia. Si existe este tipo de transmisión o la secuenciación de *GJB1* no revela ninguna mutación causal, los siguientes genes a tener en cuenta podrían ser *MPZ*, *DNM2* o *YARS*. En cualquier caso, la frecuencia de los mismos no es mucho mayor que la de otros genes más raros (*INF2*, *GNB4*, *KARS*, *PLEKHG5*, *AIFM1*, *PRPS1*, *PDK3*, etc.).

Por este motivo es esencial buscar las características fenotípicas que nos pueden orientar a un diagnóstico genético concreto (por ejemplo la presencia de glomerulopatía es sugestivo de una mutación causal en *IFN2*) y plantearnos la utilización de paneles de genes o secuenciación exómica.

El estudio genético de pacientes con **CMT axonal** debe orientarse según el patrón de herencia. De esta manera, en los pacientes con CMT2 y una herencia AR el primer gen que se debe secuenciar sería *GDAP1*, mayormente teniendo en cuenta las características poblacionales descritas. Si este es negativo se pueden considerar genes algo menos frecuentes (*LMNA*, *NEFL*, *MED25*, *LRSAM1*, *HINT1*, *TRIM2*, etc.), apoyándonos siempre en el fenotipo.

En los pacientes con una herencia dominante o desconocida existe una gran heterogeneidad genética. Teniendo en cuenta los datos de nuestra serie, los genes más frecuentemente implicados serían *GJB1* (siempre que no exista transmisión varón-varón) y *GDAP1*. Pese a ello, hay que tener en cuenta que en la gran mayoría de estudios publicados el gen más frecuentemente afectado es *MFN2*, que en nuestra serie es una causa testimonial. Por este motivo estos 3 genes, así como *MPZ*, deben ser los primeros en ser estudiados. Si en estos 4 genes no se encuentra la mutación causal las posibilidades aumentan exponencialmente, y se debe buscar mutaciones en genes menos frecuentes (*NEFL*, *GARS*, *HSPB1*, *HSPB8*, *DNM2*, *AARS*, *MARS*, *HARS*, *LRSAM1*, *TRPV4*, *RAB7*, etc.). En estas situaciones es donde entran en juego tanto la orientación fenotípica (por ejemplo inicio en miembros superiores y *GARS*), como las nuevas tecnologías, ya que es un escenario propicio para la utilización de paneles de genes o de secuenciación exómica.

6) CONCLUSIONES

a. En castellano:

- i. Objetivo general: Describir la distribución mutacional de pacientes con CMT evaluados en el Hospital Universitari i Politècnic La Fe durante el periodo de 1990-2012 y compararla con otras poblaciones

El análisis de la distribución mutacional de pacientes con CMT seguidos en el Hospital Universitari i Politècnic La Fe (centro de referencia para esta patología en la Comunidad Valenciana) confirma que la misma tiene características diferenciadoras con otras series publicadas. Entre ellas destaca la elevada frecuencia de formas con herencia autosómica recesiva y de mutaciones causales en el gen *GDAP1*.

La frecuencia de pacientes con herencia recesiva es explicable en parte por la existencia de un grupo de pacientes con mutaciones recesivas en el gen *GDAP1* y principalmente por una numerosa población de etnia gitana, que presentan mutaciones fundadoras causales de CMT4. La elevada frecuencia de mutaciones en el gen *GDAP1* en los pacientes con un subtipo axonal probablemente esté en relación con un presumible efecto fundador de la mutación p.R120W en el oeste de Europa.

- ii. Objetivo específico: Profundizar en la caracterización del fenotipo de pacientes con mutaciones que aporten rasgos diferenciadores con respecto a otras series.

Para ello se trató de ampliar el conocimiento fenotípico de los pacientes con mutaciones dominantes en *GDAP1*, recesivas en *SH3TC2*, así como de las mutaciones noveles que se detectaron.

La elevada frecuencia de pacientes con la mutación p.R120W en *GDAP1* en nuestra serie clínica motivó que se tratase de definir con exactitud el fenotipo de dichos pacientes. Se observó un cuadro leve-moderado con amplia variabilidad clínica, una afectación

equivalente de la flexión y extensión del tobillo y un patrón de RM muscular de pantorrillas característico.

Las mutaciones recesivas en *SH3TC2* se estudiaron mediante la realización de un estudio vestibular, observando una disfunción vestibular objetivable en todos los pacientes y muy marcada en el 70% de los mismos. Dicha vestibulopatía probablemente influye deletéreamente en la estabilidad del paciente, y puede modificar las estrategias rehabilitadoras empleadas.

Aparte, se aporta información fenotípica detallada de las 13 mutaciones que no habían sido descritas previamente. Entre ellas destaca uno de los pocos casos descritos de una neuropatía hipomielinizante congénita debida a una mutación novel en el gen *MPZ*.

- iii. Objetivo específico: Proponer algoritmos diagnósticos para poder orientar el cribaje mutacional de pacientes afectos de enfermedad de Charcot-Marie-Tooth en la Comunidad Valenciana..

Gracias a la distribución mutacional encontrada y a los estudios fenotípicos realizados, y teniendo en cuenta el conocimiento previo acumulado, se proponen una serie de algoritmos diagnósticos para orientar el cribaje mutacional de futuros pacientes con CMT en la Comunidad Valenciana. Hasta qué punto dichos algoritmos son extrapolables a otras poblaciones cercanas debe ser valorado en años venideros, mediante la realización de cribajes mutacionales comparables en otras áreas de España o de países mediterráneos.

b. En inglés:

- i. General aim: To describe the mutational distribution of patients with CMT followed during 1990-2012 in Hospital Universitari i Politècnic La Fe and compare it with other published series

The analysis of the mutational distribution of the CMT patients followed in Hospital Universitari i Politècnic La Fe, the referral center for this disease in the Valencian Region, confirms that it has differentiating characteristics when compared to those of other populations. The two most remarkable are the high frequency of patients with autosomal recessive inheritance, and of causal mutations in the *GDAP1* gene.

The first can be explained partly by the presence of a group of patients with AR mutations in *GDAP1*, and especially because of the high proportion of patients with Gypsy ethnicity in our population. In these patients the most common genetic defect was recessive mutations in *SH3TC2*, which caused a severe neuropathy with great postural imbalance. The second is in part due to the high number of patients with the dominant p.R120W mutation in *GDAP1*, which probably has a founder effect in Western Europe.

- ii. Specific aim: To describe in depth the clinical characteristics of patients with mutations that provide differentiating features with other clinical series

The studies performed to achieve this aim were in patients with dominant *GDAP1* mutations, recessive *SH3TC2* mutations, and novel mutations in other genes.

The dominant p.R120W mutation in *GDAP1* causes a mild-moderate phenotype with variable severity, analogous weakness in ankle dorsi and plantar flexion, and characteristic findings in calf MRI.

In patients with recessive *SH3TC2* mutations we decided to study the vestibular system, finding important vestibulopathy in all patients and completely unexcitable vestibular systems in 70%. This vestibular dysfunction negatively influences stability, and may modify the rehabilitation strategies employed.

The description of the CMT series includes the phenotypic characterization of 13 novel mutations, including one of the few cases described with congenital hypomyelinating neuropathy due to mutations in *MPZ*.

- iii. Specific aim: To propose specific diagnostic algorithms for rational mutational screening in patients with CMT in the Valencian Region.

Based on the mutational distribution, the phenotypic descriptions, and taking into account previous knowledge, we elaborated a series of diagnostic algorithms to rationalize the genetic screening of future CMT patients in the Valencian Region. Further studies are needed to see if these algorithms are applicable to other areas of Spain or Mediterranean countries.

7) BIBLIOGRAFÍA

1. Sherman DL, Brophy PJ. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6:683-90.
2. Berthold CH. Morphology of normal peripheral axons. Waxman SGed. *Physiology and pathobiology of axons.* New York: Raven Press;1978:3-63.
3. Guyton AC, Hall JE. *Membrane Potentials and Action Potentials.* Guyton and Hall-Textbook of Medical Physiology, 12th edition. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders;2006:57-71.
4. Quet F, Preux PM, Huerta M, *et al.* Determining the burden of neurological disorders in populations living in tropical areas: who would be questioned? Lessons from a Mexican rural community. *Neuroepidemiology.* 2011;36:194-203.
5. Bharucha NE, Bharucha AE, Bharucha EP. Prevalence of peripheral neuropathy in the Parsi community of Bombay. *Neurology.* 1991;41:1315-17.
6. Pardo J, Gutiérrez-Rivas E, Guijarro M. *Polineuropatías.* Julio Pascual Gomez, *Tratado de Neurología.* Madrid: Luzan 5 S.A;2012:949-86.
7. Parry GJ. Mononeuropathy multiplex. *Muscle Nerve.* 1985;8:493-98.
8. Hughes R. Peripheral nerve diseases: the bare essentials. *Pract Neurol.* 2008;8:396-405.
9. England JD, Asbury AK. Peripheral neuropathy. *Lancet.* 2004;363:2151-61.
10. Wein TH, Albers JW. Electrodiagnostic approach to the patient with suspected peripheral polyneuropathy. *Neurol Clin.* 2002;20:503-26.
11. Reilly MM. Sorting out the inherited neuropathies. *Pract Neurol.* 2007;7:93-105.
12. Foley C, Schofield I, Eglon G, *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease in Northern England. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2012;83:572-73.

13. Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot Marie Tooth's disease. *Clin Genet.* 1974;6:98-118.
14. Combarros O, Calleja J, Polo JM, Berciano J. Prevalence of hereditary motor and sensory neuropathy in Cantabria. *Acta Neurol Scand.* 1987;75:9-12.
15. Cuesta A, Pedrola L, Sevilla T, *et al.* The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet.* 2002;30:22-25.
16. Zimon M, Baets J, Fabrizi GM, *et al.* Dominant *GDAP1* mutations cause predominantly mild CMT phenotypes. *Neurology.* 2011;77:540-48.
17. Birouk N, Gouider R, Le Guern E, *et al.* Charcot–Marie–Tooth disease type 1A with 17p11.2 duplication. Clinical and electrophysiological phenotype study and factors influencing disease severity in 119 cases. *Brain.* 1997;120:813-23.
18. Dyck PJ, Lambert EH. Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy II. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in various neuronal degenerations. *Arch Neurol.* 1968b;18:619-25.
19. Harding AE, Thomas PK. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain.* 1980;103:259-80.
20. Szigeti K, Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth disease. *Eur J Hum Genet.* 2009;17:703-10.
21. Pareyson D, Marchesi C. Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *Lancet Neurol.* 2009;8:654-67.
22. Azzedine H, Senderek J, Rivolta C, Chrast R. Molecular Genetics of Charcot-Marie-Tooth Disease: From Genes to Genomes. *Mol Syndromol.* 2012;3:204-14.

23. Warner LE, Hilz MJ, Appel SH, *et al.* Clinical phenotypes of different *MPZ* mutations may include Charcot Marie tooth type 1B, Dejerinne Sottas, and congenital hypomyelination. *Neuron*. 1996;17:451-60.
24. Antonellis A, Ellsworth RE, Sambuughin N, *et al.* Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V. *Am J Hum Genet*. 2003;72:1293-99.
25. Timmerman V, Clowes VE, Reid E. Overlapping molecular pathological themes link Charcot-Marie-Tooth neuropathies and hereditary spastic paraplegias. *Exp Neurol*. 2013;246:14-25.
26. Berciano J, Sevilla T, Casasnovas C, *et al.* Guidelines for molecular diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurología*. 2012;27:169-78.
27. Snipes GJ, Suter U, Welcher AA, Shooter EM. Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/SR13). *J Cell Biol*. 1992;117:225-38.
28. Timmerman V, Raeymaekers P, de Jonghe P, *et al.* Assignment of the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1 (CMT 1A) gene to 17p11.2-p12. *Am J Hum Genet*. 1990;47:680-85.
29. Valentijn LJ, Baas F, Zorn I, *et al.* Alternatively sized duplication in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Hum Mol Genet*. 1993;2:2143-46.
30. Liu P, Gelowani V, Zhang F, *et al.* Mechanism, prevalence, and more severe neuropathy phenotype of the Charcot-Marie-Tooth type 1A triplication. *Am J Hum Genet*. 2014;94:462-69.
31. Lupski JR, Wise CA, Kuwano A, *et al.* Gene dosage is a mechanism for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet*. 1992;1:29-33.

32. Krajewski KM, Lewis RA, Fuerst DR *et al.* Neurological dysfunction and axonal degeneration in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain*. 2000;123:1516-27.
33. Chance PF, Alderson MK, Leppig KA, *et al.* DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell*. 1993;72:143-51.
34. Gabriel JM, Erne B, Pareyson D, *et al.* Gene dosage effects in hereditary peripheral neuropathy. Expression of peripheral myelin protein 22 in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies nerve biopsies. *Neurology*. 1997;49:1635-40.
35. Bai Y, Zhang X, Katona I, *et al.* Conduction block in *PMP22* deficiency. *J Neurosci*. 2010;30:600-08.
36. Nicholson GA, Valentijn LJ, Cherryson AK, *et al.* A frame shift mutation in the *PMP22* gene in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Nat Genet*. 1994;6:263-66.
37. Russo M, Laura M, Polke JM, *et al.* Variable phenotypes are associated with *PMP22* missense mutations. *Neuromuscul Disord*. 2011;21:106-14.
38. Hayasaka K, Himoro M, Sato W, *et al.* Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P0 gene. *Nat Genet*. 1993;5:31-34.
39. Shy ME, Jani A, Krajewski K, *et al.* Phenotypic clustering in *MPZ* mutations. *Brain*. 2004;127:371-84.
40. Maeda MH, Mitsui J, Soong BW, *et al.* Increased gene dosage of myelin protein zero causes Charcot-Marie-Tooth disease. *Ann Neurol*. 2012;71:84-92.
41. Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, *et al.* Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science*. 1993;262:2039-42.

42. Shy ME, Siskind C, Swan ER, *et al.* CMT1X phenotypes represent loss of *GJB1* gene function. *Neurology*. 2007;68:849-55.
43. Mersiyanova IV, Perepelov AV, Polyakov AV, *et al.* A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene. *Am J Hum Genet*. 2000;67:185-86.
44. Yum SW, Zhang J, Mo K, *et al.* A novel recessive *NEFL* mutation causes a severe, early-onset axonal neuropathy. *Ann Neurol*. 2009;66:759-70.
45. Jordonova A, De Jonghe P, Boerker CF, *et al.* Mutations in the neurofilament light chain gene (*NEFL*) cause early onset severe Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain*. 2003;126:590-97.
46. Evgrafov OV, Mersiyanova I, Irobi J, *et al.* Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nat Genet*. 2004;36:602-06.
47. Tang BS, Zhao GH, Luo W, *et al.* Small heat-shock protein 22 mutated in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2L. *Hum Genet*. 2005;116:222-24.
48. Almeida-Souza L, Asselbergh B, d'Ydewalle C, *et al.* Small heat-shock protein *HSPB1* mutants stabilize microtubules in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *J Neurosci*. 2011;31:15320-28.
49. Weedon MN, Hastings R, Caswell R, *et al.* Exome sequencing identifies a *DYNCH1* mutation in a large pedigree with dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet*. 2011;89:308-12.
50. Harms MB, Ori-McKenney KM, Scoto M, *et al.* Mutations in the tail domain of *DYNCH1* cause dominant spinal muscle atrophy. *Neurology*. 2012;78:1714-20.

51. Zhao C, Takita J, Tanaka Y, *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell*. 2001;105:587-97.
52. Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, *et al.* Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet*. 2004;36:449-51.
53. Misko A, Jiang S, Wegorzewska I, *et al.* Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J Neurosci*. 2010;30:4232-40.
54. Pedrola L, Espert A, Valdés-Sánchez T, *et al.* Cell expression of GDAP1 in the nervous system and pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *J Cell Mol Med*. 2008;12:679-89.
55. Baxter RV, Othmane KB, Rochelle JM, *et al.* Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet*. 2002;30:21-22.
56. Pitceathly R, Murphy S, Cottenie E, *et al.* Genetic dysfunction of MT-ATP6 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology*. 2012;79:1145-54.
57. Lopez-Gallardo E, Emperador S, Solano A, *et al.* Expanding the clinical phenotypes of MT-ATP6 mutations. *Hum Mol Genet*. 2014, ;23:6191-200.
58. Niemann A, Berger P, Suter U. Pathomechanisms of mutant proteins in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med*. 2006;8:217-42.
59. Jordanova A, Irobi J, Thomas FP, *et al.* Disrupted function and axonal distribution of mutant tyrosyl-tRNA-synthetase in dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Nat Genet*. 2006;38:197-202.

60. Latour P, Thauvin-Robinet C, Baudalet-Mery C, *et al.* A major determinant for binding and aminoacylation of t-RNA (Ala) in cytoplasmic Alanyl-tRNA synthetase is mutated in dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet.* 2010;86:77-82.
61. Street V, Goldy J, Golden A, *et al.* Mapping of Charcot-Marie-Tooth disease type 1C to chromosome 16p identifies a novel locus for demyelinating neuropathies. *Am J Hum Genet.* 2002;70:244-50.
62. 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.
63. Bolino A, Muglia M, Conforti FL, *et al.* Charcot-Marie-Tooth type 4B is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2. *Nat Genet.* 2000;25:17-19.
64. Senderek J, Bergmann C, Weber S, *et al.* Mutation of the *SBF2* gene, encoding a novel member of the myotubularin family, in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 4B2/11p15. *Hum Mol Genet.* 2003;12:349-56.
65. Azzedine H, Bolino A, Taieb T, *et al.* Mutations in *MTMR13*, a new pseudophosphatase homologue of MTMR2 and Sbf1, in two families with an autosomal recessive demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease associated with early onset glaucoma. *Am J Hum Genet.* 2003;72:41-53.
66. Nakhro K, Park JM, Hong YB, *et al.* SET binding factor 1 (SBF1) mutation causes Charcot-Marie-Tooth disease type 4B3. *Neurology.* 2013;81:165-73.
67. Chow CY, Zhang Y, Dowling JJ, *et al.* Mutation of *FIG4* causes neurodegeneration in pale tremor mouse and patients with CMT4J. *Nature.* 2007;448:68-72.

68. Vaccari I, Dina G, Thonchère H, *et al.* Genetic interaction between *MTMR2* and *FIG4* phospholipid phosphatases involved in Charcot-Marie-Tooth neuropathies. *PLoS Genet.* 2011;7:e1002319.
69. Züchner S, Noureddine M, Kennerson M, *et al.* Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Genet.* 2005;37:289-94.
70. Bitoun M, Maugenre S, Jeannet PY, *et al.* Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat Genet.* 2005;37:1207-09.
71. Verhoeven K, De Jonghe P, Coen K, *et al.* Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein *RAB7* cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy. *Am J Hum Genet.* 2003;72:722-27.
72. Liu TT, Gomez TS, Sacekey BK, *et al.* Rab GTP-ase regulation of retromer-mediated cargo export during endosome maturation. *Mol Biol Cell.* 2012;23:2505-15.
73. Delague V, Jacquier A, Hamadouche T, *et al.* Mutations in *FGD4* encoding the Rho GDP/GTP exchange factor FRABIN cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4H. *Am J Hum Genet.* 2007;81:1-16.
74. Horn M, Baumann R, Pereira JA, *et al.* Myelin is dependent on the Charcot-Marie-Tooth type 4H disease culprit protein FRABIN/FGD4 in Schwann cells. *Brain.* 2012;135:3567-83.
75. Senderek J, Bergmann C, Stendel C, *et al.* Mutations in a gene encoding a novel SH3/TPR domain protein cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4C neuropathy. *Am J Hum Genet.* 2003;73:1106-19.

76. Lupo V, Galindo MI, Martínez-Rubio D, *et al.* Missense mutations in the SH3TC2 protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4C affect its localization in the plasma membrane and endocytic pathway. *Hum Mol Genet.* 2009;23:4603-14.
77. Guersney DL, Jiang H, Bedard K, *et al.* Mutation in the gene encoding ubiquitin ligase LRSAM1 in patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *PLoS Genet.* 2010;6:e1001081.
78. Weterman MAJ, Sorrentino V, Kasher PR, *et al.* A frameshift mutation in *LRSAM1* is responsible for a dominant hereditary polyneuropathy. *Hum Mol Genet.* 2012;21:358-70.
79. Boerkoel CF, Takashima H, Stankiewicz P, *et al.* Periaxin mutations cause recessive Dejerine-Sottas neuropathy. *Am J Hum Genet.* 2001;68:325-33.
80. Guilbot A, Williams A, Ravise N, *et al.* A mutation in periaxin is responsible for CMT4F, an autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mol Genet.* 2001;10:415-21.
81. Marchesi C, Milani M, Morbin M, *et al.* Four novel cases of periaxin-related neuropathy and review of the literature. *Neurology.* 2010;75:1830-38.
82. De Sandre-Giovannoli A, Chaouch M, Kozlov S, *et al.* Homozygous defects in *LMNA*, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet.* 2002;70:726-36.
83. Schreiber KH, Kennedy BK. When lamins go bad: nuclear structure and disease. *Cell.* 2013;152:1365-75.

84. Warner LE, Mancias P, Butler IJ, *et al.* Mutations in the early growth response 2 (*EGR2*) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet.* 1998;18:382-84.
85. LeBlanc SE, Ward RM, Svaren J. Neuropathy-associated *EGR2* mutants disrupt cooperative activation of myelin protein zero by *EGR2* and *SOX10*. *Mol Cell Biol.* 2007;27:3521-29.
86. Leal A, Huehne K, Bauer F, *et al.* Identification of the variant Ala335Val of *MED25* as responsible for CMT2B2: molecular data, functional studies of the SH3 recognition motif and correlation between wild-type *MED25* and *PMP22* RNA levels in CMT1A animal models. *Neurogenetics.* 2009;10:275-87.
87. Landoure G, Zdebik AA, Martinez TL, *et al.* Mutations in *TRPV4* cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2C. *Nat Genet.* 2010;42:170-74.
88. Kim HJ, Sohn KM, Shy ME, *et al.* Mutations in *PRPS1*, which encodes the phosphoribosyl pyrophosphate synthetase enzyme critical for nucleotide biosynthesis, cause hereditary peripheral neuropathy with hearing loss and optic neuropathy (CMTX5). *Am J Hum Genet.* 2007;81:552-58.
89. Kalaydjieva L, Gresham D, Gooding R, *et al.* N-myc downstream-regulated gene 1 is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy-Lom. *Am J Hum Genet.* 2000;67:47-58.
90. Rogers T, Chandler D, Angelicheva D, *et al.* A novel locus for autosomal recessive peripheral neuropathy in the *EGR2* region on 10q23. *Am J Hum Genet.* 2000;67:664-67.
91. King RH, Chandler D, Lopatnicki S, *et al.* *NDRG1* in development and maintenance of the myelin sheath. *Neurobiol Dis.* 2011;42:368-80.

92. Boyer O, Nevo F, Plaisier E, *et al.* *INF2* mutations in Charcot–Marie–Tooth disease with glomerulopathy. *N Engl J Med.* 2011;365:2377-88.
93. Mathis S, Funalot B, Boyer D, *et al.* Neuropathologic characterization of *INF2*-related Charcot-Marie-Tooth disease: evidence for a Schwann cell actinopathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2014;73:223-33.
94. Kennerson ML, Yiu EM, Chuang DT, *et al.* A new locus for X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX6) is caused by mutations in the pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 3 (*PDK3*) gene. *Hum Mol Genet.* 2013;22:1404-16.
95. Saporta AS, Sottile SL, Miller LJ, *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol.* 2011;69:22-33.
96. Murphy SM, Laura M, Fawcett K, *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2012;83:706-10.
97. Gess B, Schirmacher A, Boentert M, Young P. Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes in a German neuromuscular center population. *Neuromuscul Disord.* 2013;23:647-51.
98. Benedetti S, Previtali SC, Coviello S, *et al.* Analyzing Histopathological Features of Rare Charcot-Marie-Tooth Neuropathies to Unravel Their Pathogenesis. *Arch Neurol.* 2010;67:1498-505.
99. Østern R, Fagerheim T, Hjellnes H, *et al.* Diagnostic laboratory testing for Charcot Marie Tooth disease (CMT): the spectrum of gene defects in Norwegian patients with CMT and its implications for future genetic test strategies. *BMC Med Genet.* 2013;14:94.

100. Thomas PK, Marques W, Davis MB, *et al.* The phenotypic manifestations of chromosome 17p11.2 duplication. *Brain.* 1997;120:465-478.
101. Van Paassen BW, van der Kooi AJ, van Spaendonck-Zwarts KY, *et al.* PMP22 related neuropathies: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:38.
102. Ribiere C, Bernardin M, Sacconi S, *et al.* Pain assessment in Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease. *Ann Phys Rehabil Med.* 2012;55:160-173.
103. Berciano J, Gallardo E, García A, *et al.* New insights into the pathophysiology of pes cavus in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. *J Neurol.* 2011;258:1594-602.
104. Carvalho AA, Vital A, Ferrer X, *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: clinicopathological correlations in 24 patients. *J Peripher Nerv Syst.* 2005;10:85-92.
105. Boentert M1, Knop K, Schuhmacher C, *et al.* Sleep disorders in Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2014;85:319-25.
106. Verhagen WI, Huygen PL, Gabreels-Festen AA, *et al.* Sensorineural hearing impairment in patients with *PMP22* duplication, deletion, and frameshift mutations. *Otol Neurotol.* 2005;26:405-14.
107. Rance G, Ryan MM, Bayliss K, *et al.* Auditory function in children with Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain.* 2012;135:1412-22.
108. Kaku DA, Parry GJ, Malamut R, *et al.* Nerve conduction studies in Charcot-Marie-Tooth polyneuropathy associated with a segmental duplication of chromosome 17. *Neurology.* 1993;43:1806-08.

109. Shy ME, Blake J, Krajewski K, *et al.* Reliability and validity of the CMT neuropathy score as a measure of disability. *Neurology*. 2005;64:1209-14.
110. Murphy SM, Herrmann DN, Mc Dermott MP, *et al.* Reliability of the CMT neuropathy score (second version) in Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst*. 2011;16:191-98.
111. Shy ME, Chen L, Swan ER, *et al.* Neuropathy progression in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Neurology*. 2008;70:378-83.
112. Verhamme C, van Schaik IN, Koelman J, *et al.* The natural history of Charcot-Marie-Tooth type 1A in adults: a 5-year follow-up study. *Brain*. 2009;132:3252-62.
113. Pareyson D, Reilly MM, Schenone A, *et al.* Ascorbic acid in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT-TRIAAL and CMT-TRAUK): a double-blind randomised trial. *Lancet Neurol*. 2011;10:320-28.
114. Lewis RA, McDermott MP, Herrmann DN, *et al.* High-dosage ascorbic acid treatment in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: results of a randomized, double-masked, controlled trial. *JAMA Neurol*. 2013;70:981-87.
115. Pelayo-Negro AL, Gallardo E, García A, *et al.* Evolution of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication: a 2-year clinico-electrophysiological and lower-limb muscle MRI longitudinal study. *J Neurol*. 2014;261:675-85.
116. Berciano J, Gallardo E, García A, *et al.* Clinical progression in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication: clinico-electrophysiological and MRI longitudinal study of a family. *J Neurol*. 2010;257:1633-41.
117. Sereda MW, Meyer Z, Suter U, *et al.* Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nat Med*. 2003;9:1533-37.

118. Sahenk Z, Nagaraja HN, McCracken BS, *et al.* NT-3 promotes nerve regeneration and sensory improvement in CMT1A mouse models and in patients. *Neurology*. 2005;65:681-89.
119. Sman AD, Raymond J, Refshauge KM, *et al.* Randomised controlled trial protocol of foot and ankle exercise for children with Charcot-Marie-Tooth disease. *J Physiother*. 2014;60:55.
120. Piscoquito G, Reilly MM, Schenone A, *et al.* for the CMT-TRIAAL & CMT-TRAUK Group. Is overwork weakness relevant in Charcot-Marie-Tooth disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014;85:1354-58.
121. Ramdharry GM, Day BL, Reilly MM, Marsden JF. Foot drop splints improve proximal as well as distal leg control during gait in Charcot-Marie-Tooth disease. *Muscle Nerve*. 2012;46:512-19.
122. Videler A, Eijffinger E, Nollet F, Beelen A. A thumb opposition splint to improve manual dexterity and upper-limb functioning in Charcot-Marie-Tooth disease. *J Rehabil Med*. 2012;44:249-53.
123. Ward CM, Dolan LA, Bennett DL, *et al.* Long-term results of reconstruction for treatment of a flexible cavovarus foot in Charcot-Marie-Tooth disease. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90:2631-42.
124. Matyjasik-Liggett M, Wittman P. The utilization of occupational therapy services for persons with Charcot-Marie-Tooth disease. *Occup Ther Health Care*. 2013;27:228-37.
125. Birouk N, LeGuern E, Maisonobe T, *et al.* X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with connexin 32 mutations: clinical and electrophysiologic study. *Neurology*. 1998;50:1074-82.

126. Arthur-Farraj PJ, Murphy SM, Laura M, *et al.* Hand weakness in Charcot-Marie-Tooth disease 1X. *Neuromuscul Disord.* 2012;22:622-26.
127. Scherer SS, Kleopa KA. X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst.* 2012;17:9-13.
128. Siskind CE, Murphy SM, Ovens R, *et al.* Phenotype expression in women with CMT1X. *J Peripher Nerv Syst.* 2011;16:102-07.
129. Murphy SM, Ovens R, Polke J, *et al.* X inactivation in females with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscul Disord.* 2012;22:617-21.
130. Nicholson G, Corbett A. Slowing of central conduction in X-linked Charcot-Marie-Tooth neuropathy shown by brain stem auditory evoked responses. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1996;61:43-46.
131. Schelhaas HJ, Van Engelen BG, Gabreëls-Festen AA, *et al.* Transient cerebral white matter lesions in a patient with connexin 32 missense mutation. *Neurology.* 2002;14:2007-08.
132. Tabaraud F, Lagrange E, Sindou P, *et al.* Demyelinating X-linked Charcot-Marie-Tooth disease: unusual electrophysiological findings. *Muscle Nerve.* 1999;22:1442-47.
133. Gutierrez A, England JD, Sumner AJ, *et al.* Unusual electrophysiological findings in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *Muscle Nerve.* 2000;23:182-88.
134. Szigeti K, Saifi GM, Armstrong D, *et al.* Disturbance of muscle fiber differentiation in congenital hypomyelinating neuropathy caused by a novel myelin protein zero mutation. *Ann Neurol.* 2003;54:398-402.

135. Gabreels-Festen AA, Hoogendijk JE, Meijerink PH, *et al.* Two divergent types of nerve pathology in patients with different P0 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology*. 1996;47:761-65.
136. De Jonghe P, Timmerman V, Ceuterick C, *et al.* The Thr124Met mutation in the peripheral myelin protein zero (*MPZ*) gene is associated with a clinically distinct Charcot-Marie-Tooth phenotype. *Brain*. 1999;122:281-90.
137. Reyes-Marin K, Jimenez-Pancho J, Pozo L, *et al.* A novel myelin protein zero (V136G) homozygous mutation causing late onset demyelinating polyneuropathy with brain white matter lesions. *Clin Neurol Neurosurg*. 2011;113:243-44.
138. Marrosu MG, Vaccargiu S, Marrosu G, *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease type 2 associated with mutation of the myelin protein zero gene. *Neurology*. 1998;50:1397-1401.
139. De Angelis MV, Di Muzio A, Capasso M, *et al.* Segmental conduction abnormalities and myelin thickenings in Val102/fs null mutation of *MPZ* gene. *Neurology*. 2004;63:2180-83.
140. Verhoeven K, Claeys KG, Züchner S, *et al.* *MFN2* mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain*. 2006;129:2093-102.
141. Feely SM, Laura M, Siskind CE, *et al.* *MFN2* mutations cause severe phenotypes in most patients with CMT2A. *Neurology*. 2011;76:1690-96.
142. Bombelli F, Stojkovic T, Dubourg O, *et al.* Charcot-Marie-Tooth Disease Type 2A: From Typical to Rare Phenotypic and Genotypic Features. *JAMA Neurol*. 2014;71:1036-42.

143. Calvo J, Funalot B, Ouvrier RA, *et al.* Genotype-phenotype correlations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2 caused by mitofusin 2 mutations. *Arch Neurol.* 2009;66:1511-16.
144. Chung KW, Kim SB, Park KD, *et al.* Early onset severe and late-onset mild Charcot-Marie-Tooth disease with mitofusin 2 (*MFN2*) mutations. *Brain.* 2006;129:2103-18.
145. Vallat JM, Ouvrier RA, Pollard JD, *et al.* Histopathological findings in hereditary motor and sensory neuropathy of axonal type with onset in early childhood associated with mitofusin 2 mutations. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008;67:1097-1102.
146. Auranen M, Ylikallio E, Toppila J, *et al.* Dominant *GDAP1* founder mutation is a common cause of axonal Charcot-Marie-Tooth disease in Finland. *Neurogenetics.* 2013;14:123-32.
147. Sevilla T, Jaijo T, Nauffal D, *et al.* Vocal cord paresis and diaphragmatic dysfunction are severe and frequent symptoms of *GDAP1*-associated neuropathy. *Brain.* 2008;131:3051-61.
148. Senderek J, Bergmann C, Ramaekers VT, *et al.* Mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 (*GDAP1*) gene in intermediate type autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain.* 2003;126:642-49.
149. Sevilla T, Cuesta A, Chumillas MJ, *et al.* Clinical, electrophysiological and morphological findings of Charcot-Marie-Tooth neuropathy with vocal cord palsy and mutations in the *GDAP1* gene. *Brain.* 2003;126:2023-33.
150. Sivera R, Espinos C, Vilchez JJ, *et al.* Phenotypical features of the p.R120W mutation in the *GDAP1* gene causing autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst.* 2010;15:334-44.

151. De Vries SD, Verhamme C, Van Ruissen F, *et al.* The phenotype of the Gly94fsX222 *PMP22* insertion. *J Peripher Nerv Syst.* 2011;16:113-18.
152. Luigetti M, Zollino M, Conti G, *et al.* Inherited neuropathies and deafness caused by a *PMP22* point mutation: a case report and review of the literature. *Neurol Sci.* 2013;34:1705-07.
153. Hanemann CO, D'Urso D, Gabreels-Festen AA, Muller HW. Mutation-dependent alteration in cellular distribution of peripheral myelin protein 22 in nerve biopsies from Charcot-Marie-Tooth type 1A. *Brain.* 2000;123:1001-06.
154. Gess B, Jeibmann A, Schirmacher A, *et al.* Report of a novel mutation in the *PMP22* gene causing axonal neuropathy. *Muscle Nerve.* 2011;43:605-09.
155. Eibracht M, Senderek J, Schara U, *et al.* Clinical and morphological variability of the E396K mutation in the neurofilament light chain gene in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 2E. *Clin Neuropathol.* 2014;33:335-43.
156. Miltenberger-Miltenyi G, Janecke AR, Wanschitz JV, *et al.* Clinical and electrophysiological features in Charcot-Marie-Tooth disease with mutation in the *NEFL* gene. *Arch Neurol.* 2007;64:966-70.
157. Zuchner S, Vorgerd M, Sindern E, Schroder JM. The novel neurofilament light (*NEFL*) mutation Glu397Lys is associated with a clinically and morphologically heterogeneous type of Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Neuromuscul Disord.* 2004;14:147-57.
158. Fabrizi GM, Cavallaro T, Angiari C, *et al.* Giant axon and neurofilament accumulation in Charcot-Marie-Tooth disease type 2E. *Neurology.* 2004;62:1429-31.
159. Fabrizi GM, Cavallaro T, Angiari C, *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease type 2E, a disorder of the cytoskeleton. *Brain.* 2007;130:394-403.

160. Street VA, Bennett CL, Goldy JD, *et al.* Mutation of a putative protein degradation gene LITAF/SIMPLE in Charcot-Marie-Tooth disease 1C. *Neurology*. 2003;60:22-26.
161. Latour P, Gonnaud PM, Ollagnon E, *et al.* SIMPLE mutation analysis in dominant demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease: three novel mutations. *J Peripher Nerv Syst*. 2006;11:148-55.
162. 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;25:372-83.
163. Ciotti P, Luigetti M, Geroldi A. A novel LITAF/SIMPLE mutation within a family with a demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neurol Sci*. 15;243:183-86.
164. Gerding WM, Koeting J, Epplen JT, Neusch C. Hereditary motor and sensory neuropathy caused by a novel mutation in *LITAF*. *Neuromuscul Disord*. 2009;19:701-03.
165. Bennett CL, Shirk AJ, Huynh HM, *et al.* SIMPLE mutation in demyelinating neuropathy and distribution in sciatic nerve. *Ann Neurol*. 2004;55:713-20.
166. Pareyson D, Taroni F, Botti S, *et al.* Cranial nerve involvement in CMT disease type 1 due to early growth response 2 gene mutation. *Neurology*. 2000;54:1696-98.
167. Szigeti K, Wiszniewski W, Saifi GM, *et al.* Functional, histopathologic, and natural history study of neuropathy associated with *EGR2* mutations. *Neurogenetics*. 2007;8:257-62.

168. Timmerman V, De Jonghe P, Ceuterick C, *et al.* Novel missense mutation in the early growth response 2 gene associated with a Dejerine-Sottas syndrome phenotype. *Neurology*. 1999;52:1827-32.
169. Yoshihara T, Kanda F, Yamamoto M, *et al.* A novel missense mutation in the early growth response 2 gene associated with late-onset Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *J Neurol Sci*. 2001;184:149-53.
170. Claramunt R, Sevilla T, Lupo V, *et al.* The p.R1109X mutation in *SH3TC2* gene is predominant in Spanish Gypsies with Charcot-Marie-Tooth disease type 4. *Clin Genet*. 2007;71:343-49.
171. Azzedine H, Ravise N, Verny C, *et al.* Spine deformities in Charcot-Marie-Tooth 4C caused by *SH3TC2* gene mutations. *Neurology*. 2006;67:602-06.
172. Yger M, Stojkovic T, Tardieu S, *et al.* Characteristics of clinical and electrophysiological pattern of Charcot-Marie-Tooth 4C. *J Peripher Nerv Syst*. 2012;17:112-22.
173. Houlden H, Laura M, Ginsberg L, *et al.* The phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease type 4C due to *SH3TC2* mutations and possible predisposition to an inflammatory neuropathy. *Neuromuscul Disord*. 2009;19:264-69.
174. Perez-Garrigues H, Sivera R, Vilchez JJ, *et al.* Vestibular impairment in Charcot-Marie-Tooth disease type 4C. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014;85:824-27.
175. Gabreëls-Festen A, van Beersum S, Eshuis L, *et al.* Study on the gene and phenotypic characterization of autosomal recessive demyelinating motor and sensory neuropathy (Charcot-Marie-Tooth disease) with a gene locus on chromosome 5q23-q33. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999;66:569-74.

176. Kalaydjieva L, Nikolova A, Tournev I, *et al.* Hereditary motor and sensory neuropathy - Lom, a novel demyelinating neuropathy associated with deafness in Gypsies: clinical, electrophysiological and nerve biopsy findings. *Brain*. 1998;121:399-408.
177. J. Dacković, M. Keckarević-Marković, Z. Komazec *et al.* Hereditary motor and sensory neuropathy Lom type in a Serbian family. *Acta Myol*. 2008;27:59-62.
178. Colomer J, Iturriaga J, Kalaydjieva L, *et al.* Hereditary motor and sensory neuropathy-Lom (HMSNL) in a Spanish family: clinical, electrophysiological, pathological and genetic studies. *Neuromuscul Disord*. 2000;10:578-83.
179. Ishpekova BA, Christova LG, Alexandrov AS, Thomas PK. The electrophysiological profile of hereditary motor and sensory neuropathy-Lom. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76:875-78.
180. King RH, Tournev I, Colomer J, *et al.* Ultrastructural changes in peripheral nerve in hereditary motor and sensory neuropathy-Lom. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1999;25:306-12.
181. Thomas PK, Kalaydjieva L, Youl B, *et al.* Hereditary motor and sensory neuropathy-Russe: a new autosomal recessive neuropathy in Balkan Gypsies. *Ann Neurol*. 2001;50:452-57.
182. Sevilla T, Martinez-Rubio D, Marquez C, *et al.* Genetics of the Charcot-Marie-Tooth disease in the Spanish Gypsy population: the hereditary motor and sensory neuropathy Russe in depth. *Clin Genet*. 2013;83:565-70.
183. Takashima H, Boerkoel CF, De Jonghe P, *et al.* Periaxin mutations cause a broad spectrum of demyelinating neuropathies. *Ann Neurol*. 2002;51:709-15.

184. Tokunaga S, Hashiguchi A, Yoshimura A, *et al.* Late-onset Charcot-Marie-Tooth disease 4F caused by periaxin gene mutation. *Neurogenetics*. 2012;13:356-65.
185. Kijima K, Numakura C, Shirahata E, *et al.* Periaxin mutations causes early-onset but slow progressive Charcot-Marie-Tooth disease. *J Hum Genet*. 2004;49:376-79.
186. De Sandre-Giovannoli A, Delague V, Hamadouche T, *et al.* Homozygosity mapping of autosomal recessive demyelinating Charcot-Marie-Tooth neuropathy (CMT4H) to a novel locus on chromosome 12p11.21-q13.11. *J Med Genet*. 2005;42:260-65.
187. Houlden H, Hammans S, Katifi H, *et al.* A novel frabin (*FGD4*) nonsense mutation p.R275X associated with phenotypic variability in CMT4H. *Neurology*. 2009;72:617-20.
188. Fabrizi GM, Taioli F, Cavallaro T, *et al.* Further evidence that mutations in *FGD4*/frabin cause Charcot-Marie-Tooth disease type 4H. *Neurology*. 2009;72:1160-64.
189. Zhang X, Chow CY, Sahenk Z, *et al.* Mutation of *FIG4* causes a rapidly progressive, asymmetric neuronal degeneration. *Brain*. 2008;131:1990-2001.
190. Cottenie E, Menezes MP, Rossor AM, *et al.* Rapidly progressive asymmetrical weakness in Charcot-Marie-Tooth disease type 4J resembles chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy *Neuromuscul Disord*. 2013;23:399-403.
191. Nicholson G, Lenk GM, Reddel SW, *et al.* Distinctive genetic and clinical features of CMT4J: a severe neuropathy caused by mutations in the PI(3,5)P phosphatase *FIG4*. *Brain*. 2011;134:1959-71.
192. Quattrone A, Gambardella A, Bono F, *et al.* Autosomal recessive hereditary motor and sensory neuropathy with focally folded myelin sheaths: clinical,

- electrophysiologic, and genetic aspects of a large family. *Neurology*. 1996;46:1318-24.
193. Houlden H, King RH, Wood NW, *et al*. Mutations in the 5' region of the myotubularin-related protein 2 (*MTMR2*) gene in autosomal recessive hereditary neuropathy with focally folded myelin. *Brain*. 2001;124:907-15.
194. Murakamia T, Kutokua Y, Nishimurab H, *et al*. Mild phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease type 4B1. *J Neurol Sci*. 2013;334:176-79.
195. Hirano R, Takashima H, Umehara F, *et al*. SET binding factor 2 (*SBF2*) mutation causes CMT4B with juvenile-onset glaucoma. *Neurology*. 2004;63:577-80.
196. Conforti FL, Muglia M, Mazzei R, *et al*. A new *SBF2* mutation in a family with recessive demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology*. 2004;63:1327-28.
197. Alazami AM, Alzahrani F, Bohlega S, *et al*. SET binding factor 1 (*SBF1*) mutation causes Charcot-Marie-Tooth disease type 4B3. *Neurology*. 2014;82:1665-66.
198. Saito M, Hayashi Y, Suzuki T, *et al*. Linkage mapping of the gene for Charcot-Marie-Tooth disease type 2 to chromosome 1p (*CMT2A*) and the clinical features of *CMT2A*. *Neurology*. 1997;49:1630-35.
199. Houlden H, King RH, Muddle JR, *et al*. A novel *RAB7* mutation associated with ulcero-mutilating neuropathy. *Ann Neurol*. 2004;56:586-90.
200. Auer-Grumbach M, De Jonghe P, Wagner K, *et al*. Phenotype-genotype correlations in a *CMT2B* family with refined 3q13-q22 locus. *Neurology*. 2000;55:1552-57.
201. Meggouh F, Bienfait HME, Weterman MAJ, *et al*. Charcot-Marie-Tooth disease due to a de novo mutation of the *RAB7* gene. *Neurology*. 2006;67:1476-78.

202. Manganelli F, Pisciotta C, Provitera V, *et al.* Autonomic nervous system involvement in a new CMT2B family. *J Peripher Nerv Syst.* 2012;17:361-64.
203. Chaouch M, Allal Y, De Sandre-Giovannoli A, *et al.* The phenotypic manifestations of autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth due to a mutation in Lamin A/C gene. *Neuromuscul Disord.* 2003;13:60-67.
204. Bouhouche A, Birouk N, Azzedine H, *et al.* Autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease (ARCMT2): phenotype -genotype correlations in 13 Moroccan families. *Brain.* 2007;130:1062-75.
205. Carboni N, Politano L, Floris M, *et al.* Overlapping syndromes in laminopathies: a meta-analysis of the reported literature. *Acta Myol.* 2013;32:7-17.
206. Politano L, Carboni N, Madej-Pilarczy A, *et al.* Advances in basic and clinical research in laminopathies. *Acta Myol.* 2013;32:18-22.
207. Benedetti S, Bertini E, Iannaccone S, *et al.* Dominant LMNA mutations can cause combined muscular dystrophy and peripheral neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005;76:1019-21.
208. Goizet C, Yaou RB, Demay L, *et al.* A new mutation of the lamin A/C gene leading to autosomal dominant axonal neuropathy muscular dystrophy, cardiac disease and leuconychia. *J Med Genet.* 2004;41:e29.
209. Leal A, Morera B, Del Valle G, *et al.* A second locus for an axonal form of autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease maps to chromosome 19q13.3. *Am J Hum Genet.* 2001;68:269-74.
210. Berghoff C, Berghoff M, Leal A, *et al.* Clinical and electrophysiological characteristics of autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease

- (ARCMT2B) that maps to chromosome 19q13.3. *Neuromuscul Disord.* 2004;14:301-06.
211. Dyck PJ, Litchy WJ, Minnerath S, *et al.* Hereditary motor and sensory neuropathy with diaphragm and vocal cord paresis. *Ann Neurol.* 1994;35:608-15.
212. Auer-Grumbach M, Olschewski A, Paptic L, *et al.* Alterations in the ankyrin domain of *TRPV4* cause congenital distal SMA, scapuloperoneal SMA and HMSN2C. *Nat Genet.* 2010;42:160-64.
213. Andreucci E, Aftimos S, Alcausin M, *et al.* *TRPV4* related skeletal dysplasias: a phenotypic spectrum highlighted by clinical, radiographic, and molecular studies in 21 new families. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:37.
214. Zimon M, Baets J, Auer-Grumbach M, *et al.* Dominant mutations in the cation channel gene transient receptor potential vanilloid 4 cause an unusual spectrum of neuropathies. *Brain.* 2010;133:1798-1809.
215. Chen DH, Sul Y, Weiss M, *et al.* CMT2C with vocal cord paresis associated with short stature and mutations in the *TRPV4* gene. *Neurology.* 2010;75:1968-75.
216. James PA, Cader MZ, Muntoni F, *et al.* Severe childhood SMA and axonal CMT due to anticodon binding domain mutations in the *GARS* gene. *Neurology.* 2006;67:1710-12.
217. Sivakumar K, Kyriakides T, Puls I, *et al.* Phenotypic spectrum of disorders associated with glycyl-tRNA synthetase mutations. *Brain.* 2005;128:2304-14.
218. Houlden H, Laura M, Wavrant-De Vrièze F, *et al.* Mutations in the HSP27 (*HSPB1*) gene cause dominant, recessive, and sporadic distal HMN/CMT type 2. *Neurology.* 2008;71:1660-68.

219. Solla P, Vanelli A, Bolino A, *et al.* Heat shock protein 27 R127W mutation: evidence of a continuum between axonal Charcot-Marie-Tooth and distal hereditary motor neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010;81:958-62.
220. Rossor AM, Davidson GL, Blake J, *et al.* A novel p.Glu175X premature stop mutation in the C-terminal end of *HSP27* is a cause of CMT2. *J Peripher Nerv Syst.* 2012;17:201-05.
221. Capponi S, Geroldi A, Fossa P, *et al.* *HSPB1* and *HSPB8* in inherited neuropathies: study of an Italian cohort of dHMN and CMT2 patients. *J Peripher Nerv Syst.* 2011;16:287-94.
222. Irobi J, Van Impe K, Seeman P, *et al.* Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy. *Nat Genet.* 2004;36:597-601.
223. Tang BS, Luo W, Xia K, *et al.* A new locus for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2L) maps to chromosome 12q24. *Hum Genet.* 2004;114:527-33.
224. Nakhro K, Park JM, Kim YJ, *et al.* A novel Lys141Thr mutation in small heat shock protein 22 (*HSPB8*) gene in Charcot-Marie-Tooth disease type 2L. *Neuromuscul Disord.* 2013;23:656-63.
225. Claeys KG, Züchner S, Kennerson M, *et al.* Phenotypic spectrum of dynamin 2 mutations in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain.* 2009;132:1741-52.
226. Fabrizi GM, Ferrarini M, Cavallaro T, *et al.* Two novel mutations in dynamin-2 cause axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology.* 2007;69:291-95.
227. Bitoun M, Stojkovic T, Prudhon B, *et al.* A novel mutation in the dynamin 2 gene in a Charcot-Marie-Tooth type 2 patient: clinical and pathological findings. *Neuromuscul Disord.* 2008;18:334-38.

228. Gallardo E, Claeys KG, Nelis E, *et al.* Magnetic resonance imaging findings of leg musculature in Charcot-Marie-Tooth disease type 2 due to dynamin 2 mutation. *J Neurol.* 2008;255:986-92.
229. Kennerson ML, Zhu D, Gardner RJ, *et al.* Dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy maps to chromosome 19p12-p13.2. *Am J Hum Genet.* 2001;69:883-88.
230. Zhao Z, Hashiguchi A, Hu J, *et al.* Alanyl-tRNA synthetase mutation in a family with dominant distal hereditary motor neuropathy. *Neurology.* 2012;78:1644-49.
231. McLaughlin HM, Sakaguchi R, Giblin W, *et al.* A recurrent loss-of-function alanyl-tRNA synthetase (*AARS*) mutation in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 2N (CMT2N). *Hum Mutat.* 2012;33:244-53.
232. Lin KP1, Soong BW, Yang CC, *et al.* The mutational spectrum in a cohort of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 among the Han Chinese in Taiwan. *PLoS One.* 2011;6:e29393.
233. Willemsen MH, Vissers LE, Willemsen MA, *et al.* Mutations in *DYNCH1* cause severe intellectual disability with neuronal migration defects. *J Med Genet.* 2012;49:179-83.
234. Nicolaou P, Cianchetti C, Minaidou A, *et al.* A novel *LRSAMI* mutation is associated with autosomal dominant axonal charcot-marie-tooth disease. *Eur J Hum Genet.* 2013;21:190-94.
235. Engelholm M, Sekler J, Schöndorf DC, *et al.* A novel mutation in *LRSAMI* causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease with dominant inheritance. *BMC Neurol.* 2014;14:118-25.

236. Xu WY, Gu MM, Sun LH, *et al.* A nonsense mutation in *DHTKD1* causes Charcot-Marie-Tooth disease type 2 in a large Chinese pedigree. *Am J Hum Genet.* 2012;91:1088-94.
237. Danhauser K, Sauer SW, Haack TB, *et al.* *DHTKD1* mutations cause 2-aminoadipic and 2-oxoadipic aciduria. *Am J Hum Genet.* 2012;91:1082-87.
238. Jordanova A, Thomas FP, Guergueltcheva V, *et al.* Dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth type C maps to chromosome 1p34-p35. *Am J Hum Genet.* 2003;73:1423-30.
239. Mademan I, Deconinck T, Dinopoulos A, *et al.* De novo *INF2* mutations expand the genetic spectrum of hereditary neuropathy with glomerulopathy. *Neurology.* 2013;81:1953-58.
240. Toyota K, Ogino D, Hayashi M, *et al.* *INF2* mutations in Charcot-Marie-Tooth disease complicated with focal segmental glomerulosclerosis. *J Peripher Nerv Syst.* 2013;18:97-98.
241. Park HJ, Kim HJ, Hong YB, *et al.* A novel *INF2* mutation in a Korean family with autosomal dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease and focal segmental glomerulosclerosis. *J Peripher Nerv Syst.* 2014;19:175-79.
242. Soong BW, Huang YH, Tsai PC, *et al.* Exome sequencing identifies *GNB4* mutations as a cause of dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet.* 2013;92:422-30.
243. Lee YC, Lee TC, Lin KP, *et al.* Clinical characterization and genetic analysis of a possible novel type of dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscul Disord.* 2010;20:534-39.

244. McLaughlin HM, Sakaguchi R, Liu C, *et al.* Compound heterozygosity for loss-of-function lysyl-tRNA synthetase mutations in a patient with peripheral neuropathy. *Am J Hum Genet.* 2010;87:560-66.
245. Azzedine H, Zavadakova P, Planté-Bordeneuve V, *et al.* *PLEKHG5* deficiency leads to an intermediate form of autosomal-recessive Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mol Genet.* 2013;22:4224-32.
246. Kim HJ, Hong YB, Park JM, *et al.* Mutations in the *PLEKHG5* gene is relevant with autosomal recessive intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8:104.
247. Maystadt I, Rezsöházy R, Barkats M, *et al.* The nuclear factor kappaB-activator gene *PLEKHG5* is mutated in a form of autosomal recessive lower motor neuron disease with childhood onset. *Am J Hum Genet.* 2007;81:67–76.
248. Rinaldi C, Grunseich C, Sevrioukova IF, *et al.* Cowchock syndrome is associated with a mutation in apoptosis-inducing factor. *Am J Hum Genet.* 2012;91:1095-1102.
249. Cowchock FS, Duckett SW, Streletz LJ, *et al.* X-linked motor-sensory neuropathy type-II with deafness and mental retardation: a new disorder. *Am J Med Genet.* 1985;20:307-15.
250. de Brouwer AP, van Bokhoven H, Nabuurs SB, *et al.* *PRPS1* mutations: four distinct syndromes and potential treatment. *Am J Hum Genet.* 2010;86:506-18.
251. Al-Maawali A, Dupuis L, Blaser S *et al.* Prenatal growth restriction, retinal dystrophy, diabetes insipidus and white matter disease: expanding the spectrum of *PRPS1*-related disorders. *Eur J Hum Genet.* 2014;Jun 25;doi:10.1038 (ahead of print).
252. Rosenberg RN, Chutorian A. Familial opticoacoustic nerve degeneration and polyneuropathy. *Neurology.* 1967;17:827-32.

253. Kim HJ, Hong SH, Ki CS, *et al.* A novel locus for X-linked recessive CMT with deafness and optic neuropathy maps to Xq21.32-q24. *Neurology*. 2005;64:1964-67.
254. Park J, Hyun YS, Kim YJ, *et al.* Exome Sequencing Reveals a Novel *PRPS1* mutation in a Family with CMTX5 without Optic Atrophy. *J Clin Neurol*. 2013;9:283-38.
255. Synofzik M, Müller vom Hagen J, Haack TB, *et al.* X-linked Charcot-Marie-Tooth disease, Arts syndrome, and prelingual non-syndromic deafness form a disease continuum: evidence from a family with a novel *PRPS1* mutation. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9:24.
256. Auer-Grumbach M, Weger M, Fink-Puches R, *et al.* Fibulin-5 mutations link inherited neuropathies, age-related macular degeneration and hyperelastic skin. *Brain*. 2011;134:1839-52.
257. Loeys B, Van Maldergem L, Mortier G, *et al.* Homozygosity for a missense mutation in fibulin-5 (*FBLN5*) results in a severe form of cutis laxa. *Hum Mol Genet*. 2002;11:2113-18.
258. Stone EM, Braun TA, Russell SR, *et al.* Missense variations in the fibulin 5 gene and age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2004;351:346-53.
259. Brozková DS, Lassuthová P, Neupauerová J, *et al.* Czech family confirms the link between *FBLN5* and Charcot–Marie–Tooth type 1 neuropathy. *Brain*. 2013;136:1-4.
260. Ishiura H, Sako W, Yoshida M, *et al.* The TRK-fused gene is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement. *Am J Hum Genet*. 2012;91:320-29.

261. Lee SS, Lee HJ, Park JM, *et al.* Proximal dominant hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominance association with mutation in the TRK-fused gene. *JAMA Neurol.* 2013;70:607-15.
262. Tsai PC, Huang YH, Guo YC, *et al.* A novel *TFG* mutation causes Charcot-Marie-Tooth disease type 2 and impairs TFG function. *Neurology.* 2014;83:903-12.
263. Takashima H, Nakagawa M, Nakahara K, *et al.* A new type of hereditary motor and sensory neuropathy linked to chromosome 3. *Ann. Neurol.* 1997;41:771-80.
264. Gonzalez M, McLaughlin H, Houlden H, *et al.* Inherited Neuropathy Consortium. Exome sequencing identifies a significant variant in methionyl-tRNA synthetase (*MARS*) in a family with late-onset CMT2. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013;84:1247-49.
265. Vester A, Velez-Ruiz G, McLaughlin HM, *et al.* A loss-of-function variant in the human histidyl-tRNA synthetase (*HARS*) gene is neurotoxic in vivo. *Hum Mutat.* 2013;34:191-99.
266. Zimon M, Baets J, Almeida-Souza L, *et al.* Loss-of-function mutations in *HINT1* cause axonal neuropathy with neuromyotonia. *Nat Genet.* 2012;44:1080-83.
267. Zhao H, Race V, Matthijs G, *et al.* Exome sequencing reveals *HINT1* mutations as a cause of distal hereditary motor neuropathy. *Eur J Hum Genet.* 2014;22:847-50.
268. Caetano JS, Costa C, Baets J, *et al.* Autosomal recessive axonal neuropathy with neuromyotonia: a rare entity. *Pediatr Neurol.* 2014;50:104-07.
269. Ylikallio E, Pöyhönen R, Zimon M, *et al.* Deficiency of the E3 ubiquitin ligase TRIM2 in early-onset axonal neuropathy. *Hum Mol Genet.* 2013;22:2975-83.

270. Synofzik M, Schicks J, Wilhelm C, *et al.* Charcot-Marie-Tooth hereditary neuropathy due to a mitochondrial ATP6 mutation. *Eur J Neurol.* 2012;19:e114-16.
271. Berciano J, Combarros O, Figols J, *et al.* Hereditary motor and sensory neuropathy type II. Clinicopathological study of a family. *Brain.* 1986;109:897-914.
272. Nelis E, Berciano J, Verpoorten N, *et al.* Autosomal dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2G) maps to chromosome 12q12-q13.3. *J Med Genet.* 2004;41:193-97.
273. Rossi A, Paradiso C, Cioni R, *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease: study of a large kinship with an intermediate form. *J Neurol.* 1985;232:91-98.
274. Verhoeven K, Villanova M, Rossi A, *et al.* Localization of the gene for the intermediate form of Charcot-Marie-Tooth to chromosome 10q24.1-q25.1. *Am J Hum Genet.* 2001;69:889-94.
275. Ionasescu VV, Trofatter J, Haines JL, *et al.* Heterogeneity in X-linked recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Am J Hum Genet.* 1991;48:1075-83.
276. Chung KW, Suh BC, Shy ME, *et al.* Different clinical and magnetic resonance imaging features between Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and 2A. *Neuromuscul Disord.* 2008;18:610-18.

8) APÉNDICE

a. Protocolo clínico del Hospital La Fe para pacientes con CMT.

DATOS GENERALES:

HC: (7 dígitos).....
Centro:.....
Nombre y apellidos:.....
Dirección:.....
Ciudad Provincia:.....
Teléfono:.....
Fecha y lugar de nacimiento:.....
Lugar de nacimiento padres:.....
Abuelos paternos:.....
Abuelos maternos:.....
Sexo: 1- hombre 2- mujer

Paciente (código):.....
Tipo: 1- desmielinizante
 2- axonal
 3- intermedio
 4- AED

Modo de herencia: 1- AD (transmisión H-H)
 2- Dominante (no transmisión H-H)
 3- Ligada X
 4- AR (ambos padres examinados)
 5- AR (padres no examinados o solo uno)
 6- Esporádico (ambos padres examinados)
 7- Esporádico (padres no examinados o solo uno)

ANTECEDENTES PERSONALES:

Alergias a fármacos No Si
HTA No Si
Diabetes No Si
Otras No Si
Intervenciones No Si

ANTECEDENTES FAMILIARES

Otras enfermedades No Si

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA NEUROPATÍA

Inicio de la marcha:.....
Síntomas: No Si

Inicio de los síntomas: 1- nacimiento /primeros meses
 2- retraso desarrollo motor (anda >18m)
 3- de 2-10 años
 4- de 11-20 años
 5- de 21-30 años
 6- de 31-40 años
 7- mayores de 40 años
 8- incapaz de precisar

SÍNTOMAS NEUROPÁTICOS

1. SENSITIVOS No Si

1.1. TIPO

1.1.1 Positivos No Si

a) Dolor No Si

b) Parestesias No Si

1.1.2 Negativos No Si

- Falta de tacto o acorchamiento No Si

- Menor percepción de estímulos dolorosos No Si

- Alteración en la percepción de la temperatura No Si

- Sensación de caminar sobre algodones No Si

- Inestabilidad para caminar No Si

1.2. LOCALIZACIÓN

Miembros inferiores No Si

Miembros superiores No Si

2. SÍNTOMAS AUTONÓMICOS No Si

3. SÍNTOMAS MOTORES No Si

- debilidad manos
- pérdida masa muscular
- dedos martillo
- tropiezos y caídas frecuentes
- dificultad subir escaleras
- dificultad levantarse silla
- debilidad tobillos (esguinces de tobillo frecuentes)
- pie caído
- pie cavo
- torpeza general
- poco equilibrio
- dificultad para caminar
- calambres
- otros _____

Examen (fecha):

Facial D/I:/.....

Separación hombros D/I:/.....

Flexión codo D/I:/..... Extensión codo D/I:/.....

Extensión muñeca D/I:/..... Flexión muñeca D/I:/.....

Flexión dedos D/I:/..... Extensión dedos D/I:/.....

Oposición pulgar D/I:/..... Ms intrínseca mano: D/I:/.....

Flexión cadera D/I:/..... Extensión cadera D/I:/.....

Flexión rodilla D/I:/..... Extensión rodilla D/I:/.....

Flexión tobillo D/I:/..... Extensión tobillo D/I:/.....
 Eversión D/I:/..... Inversión D/I:/.....
 Flexión dedos D/I:/..... Extensión dedos D/I:/.....
 Extensión dedo gordo D/I:/.....

Atrofia MSD:	0-no hay	1-ligera	2-moderada	3-importante
Atrofia MSI:	0-no hay	1-ligera	2-moderada	3-importante
Atrofia MID:	0-no hay	1-ligera	2-moderada	3-importante
Atrofia MII:	0-no hay	1-ligera	2-moderada	3-importante

Tembler-ataxia MSD:	0-no hay	1-ligera	2-moderada	3-importante
Tembler-ataxia MSI:	0-no hay	1-ligera	2-moderada	3-importante
Tembler-ataxia MID:	0-no hay	1-ligera	2-moderada	3-importante
Tembler-ataxia MII:	0-no hay	1-ligera	2-moderada	3-importante

Reflejos: (0= ausente, 1=reducido, 2=normal, 3=vivos) RCP (0=extensor, 1=equivoco, 2=flexor)

Reflejos MSD/MSI:/.....
 R. rotuliano D/I:/.....
 R. aquileo D/I:/.....
 RCP:/.....

Sensibilidad: (según modalidad afecta)

1- tacto	6- dolor + vibratoria + tacto
2- dolor	7- dolor + vibratoria + tacto + posición
3- normal	8- dolor + vibratoria + posición
4- vibratoria	9- dolor + tacto
5- dolor y vibratoria	0- no figura

Sensibilidad MSD/MSI:/.....
 Sensibilidad MID/MII:/.....

Deformidades:

Retracción aquilea:	1-sí	2- no		
Pies cavos:	0- no	1- ligero	2- moderado	3- grave
Mano en garra:	1-sí	2- no		
Escoliosis:	1-sí	2- no		
Hipoacusia:	1-sí	2- no		
Disfonía:	1-sí	2- no		

Otros (especificar): (Atrofia óptica, pupilas, disartria, nistagmus, RCP, Romberg)

Escala funcional:

0= movilidad normal
 1= normal, pero calambres o fatiga
 2= movilidad anormal, incapaz correr
 3= andar difícil pero posible sin ayuda (ortesis, bastón)
 4= capaz de caminar con ortesis tobillo o zapatos ortopédicos
 5= andar con bastón
 6= andar con muletas
 7= andar con andador
 8= silla de ruedas
 9= encamado

Escala Neuropática CMTNS 1:

CMTNS 2:

9-hole peg-test:

Estudio neurofisiológico (fecha):.....

EMG:
Actividad espontánea:
Signos reinervación:
Máximo esfuerzo:

CONDUCCIONES SENSITIVAS:

N. Mediano

Amplitud
Velocidad de conducción

N. Cubital

Amplitud
Velocidad de conducción

N. Sural

Amplitud
Velocidad de conducción

N. Peroneal Superficial

Amplitud
Velocidad de conducción

Otros:

CONDUCCIONES MOTORAS:

N. Mediano

Amplitud
Latencia distal
Velocidad de conducción
Bloqueo conducción

N. Cubital

Amplitud
Latencia distal
Velocidad de conducción
Bloqueo conducción

N. Axilar

Amplitud
Latencia distal
Velocidad de conducción

N. Frénico

Amplitud
Latencia distal
Velocidad de conducción

N. Peroneal

Amplitud
Latencia distal
Velocidad de conducción
Bloqueo conducción

Otros nervios:

PESS:

Analítica (fecha):
Hemograma:

Bioquímica: CK: (valores)

RM (fecha):

Cabeza

Espinal

Muscular

Biopsia nervio (fecha): 1- sí 2- no

Biopsia piel (fecha): 1-sí 2-no

Genética molecular (fecha):

Protocolo estudio escoliosis (fecha):

